

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
14 mars 2002 (14.03.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 02/20742 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12N 9/12,  
15/54, 5/10, A61K 38/00, A61P 25/28, A01K 67/027

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR01/02708

(22) Date de dépôt international : 31 août 2001 (31.08.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
00/11397 7 septembre 2000 (07.09.2000) FR

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) :  
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE** [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris  
Cedex 16 (FR).

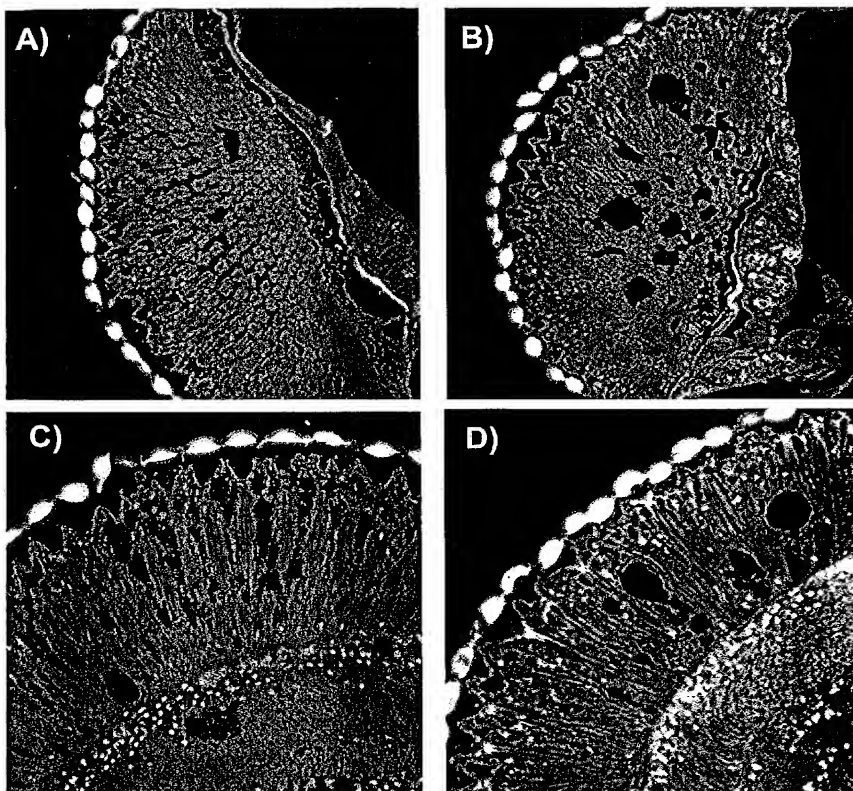
(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **TRICOIRE, Hervé** [FR/FR]; 30, rue François Coppée, F-91120 Palaiseau (FR). **MONNIER, Véronique** [FR/FR]; 103, rue Gravelle, F-94700 Maisons-Alfort (FR). **PRET, Anne-Marie** [CH/FR]; 140, rue Laségue, F-92320 Chatillon (FR). **BUSSON, Denise, Emmanuelle** [FR/FR]; 159, avenue de Suffren, F-75015 Paris (FR). **ZAHRAOUI, Jeanine** [FR/FR]; 3, rue Vauquelin, F-75005 Paris (FR). **VANDURKA, Patricia** [FR/FR];

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: USE OF IP3 KINASES FOR PREPARING MEDICINES FOR TREATING OXIDATIVE STRESS-RELATED DISEASES

(54) Titre : UTILISATION D'IP3 KINASES POUR LA PREPARATION DE MEDICAMENTS DESTINES AU TRAITEMENT DE MALADIES LIEES AU STRESS OXYDATIF



(57) Abstract: The invention concerns the use of proteins comprising or consisting of the sequences SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 or SEQ ID NO: 7, for preparing medicines for treating diseases related to oxidative stress or to endoplasmic reticulum stress, or neurodegenerative disorders, in particular retinal.

(57) Abrégé : L'invention concerne notamment l'utilisation de protéines comprenant ou constituées par les séquences SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 OU SEQ ID NO : 7, pour la préparation de médicaments destinés au traitement de maladies liées au stress oxydatif ou au stress du réticulum endoplasmique, ou de maladies neurodégénératives, notamment rétinienne.



WO 02/20742 A1



118, rue Saint-Charles, F-75015 Paris (FR). **GIRARDOT, Fabrice** [FR/FR]; 41, avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, F-94220 Charenton-Le-Pont (FR).

**(74) Mandataires :** **GROSSET-FOURNIER, Chantal** etc.; Grosset-Fournier & Demachy SARL, 20, rue de Maubeuge, F-75009 Paris (FR).

**(81) États désignés (national) :** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

**(84) États désignés (régional) :** brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publiée :**

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

## UTILISATION D'IP3 KINASES POUR LA PREPARATION DE MEDICAMENTS DESTINES AU TRAITEMENT DE MALADIES LIEES AU STRESS OXYDATIF

5

L'invention concerne l'utilisation d'IP3 kinases pour la préparation de médicaments. L'invention concerne également de nouvelles IP3 kinases et les séquences d'ADN correspondantes.

10

Les inositols phosphates et particulièrement IP3 (Ins (1,4,5) P<sub>3</sub>) ont été reconnus depuis longtemps comme des acteurs majeurs pour le contrôle des flux calciques cellulaires. IP3 se fixe sur des récepteurs IP3 (IP3R) présents dans la membrane du réticulum endoplasmique et une partie des stocks de calcium contenus dans le réticulum endoplasmique est libérée puis déversée dans le cytoplasme (Patel et al., 1999).

15

Les IP3 kinases sont des enzymes susceptibles de catalyser la réaction suivante :

ATP + 1D-myo-inositol 1,4,5 triphosphate → ADP + 1D-myo-inositol 1,3,4,5 tetrakisphosphate

20

L'IP3 kinase (IP3K) phosphoryle IP3 en inositol tetrakisphosphate IP4 (Ins (1,3,4,5) P<sub>4</sub>). IP3K agit probablement à la fois en modifiant le niveau d'IP3 mais aussi en produisant un autre second messager IP4 dont le rôle fonctionnel est encore mal connu (Fukuda et al., 1997 ; Irvine et al., 1999) : il se fixe sur une protéine de la membrane cellulaire (protéine GAP1). La diminution de la concentration de IP3 induit une diminution de l'activité du récepteur IP3R.

25

Chez la *Drosophile*, IP3R est exprimé dans les tissus musculaires et nerveux. L'absence du gène est létale. Son rôle est encore mal connu ; il est impliqué dans le déclenchement des métamorphoses larvaires mais pourrait l'être aussi dans le contrôle des processus neurosensoriels et dans le développement du muscle.

30

Chez *C.elegans*, une mutation perte de fonction dans IP3K conduit à la suppression du phénotype de stérilité, indépendant de la voie *ras*, observé dans des mutants *lin3-* (EGF). Un gain de fonction de IP3K conduit a contrario à un défaut de contraction et de dilatation de la spermathèque lors du passage des ovules et à une stérilité associée (Clandinin et al., 1998).

Le rôle fonctionnel mais aussi la spécificité des isoformes des IP3K chez les vertébrés sont encore mal connus. Cependant, plusieurs articles décrivent le clonage des

kinases humaines IP3K-A, IP3K-B et IP3K-C (Takazawa et al., 1991 ; Takazawa et al., 1991 et Communi et al., 1999).

La référence Jun et al. (1998) concerne le rôle de l'IP3K-A chez la souris. D'après cet article, un résultat récent obtenu sur la souris prouve que l'IP3K-A joue un rôle important dans les neurones. Ceux-ci ont un grand nombre de récepteurs IP3 et les stocks de  $\text{Ca}^{2+}$  jouent un grand rôle dans la potentiation ou la dépression à long terme (LTP ou LTD). Chez la souris, le récepteur IP3 de type 1 est la forme neuronale majeure exprimée dans les cellules de Purkinje, la région CA1 de l'hippocampe, le noyau caudé et le cortex. Dans le développement de la souris, de hauts niveaux d'IP3R1 sont corrélés avec des tissus subissant l'apoptose. L'absence totale de ce gène conduit à une mort prématurée, souvent in utero, et à une sévère ataxie accompagnée de crises épileptiques.

L'IP3K-B existe dans deux pools intracellulaires : l'un cytosolique, l'autre lié fortement au réseau étendu du réticulum endoplasmique et colocalisé avec rab2 (Soriano et al., 1997). Le domaine catalytique fait face au cytosol et l'association à la membrane dépend d'interactions protéine-protéine.

En réponse à l'activation de récepteurs muscariniques dans les astrocytes, les IP3K-A et B sont activées par la phosphorylation de la Cam kinase II (calcium calmoduline dépendante) (Communi et al., 1997 et 1999). L'IP3K-B est aussi activée par la phosphorylation de la PKC (Communi et al., 1999).

Le stress oxydatif est lié à la génération par les organismes aérobies d'espèces oxygénées réactives (EOR) qui peuvent provoquer des dommages intracellulaires en modifiant des macromolécules telles que les lipides, les protéines et l'ADN. Le site principal de production de ces EOR et notamment de  $\text{O}_2^-$  au cours de la respiration est la mitochondrie (Lenaz, 1998).  $\text{H}_2\text{O}_2$  est généré par la conversion de  $\text{O}_2^-$  et par le métabolisme des lipides dans les peroxysomes. Puis  $\text{O}_2^-$  peut réagir avec  $\text{H}_2\text{O}_2$ , via une réaction de Haber-Weiss catalysée par les métaux, pour former le composé très réactif OH.

Les organismes ont développé de nombreuses défenses antioxydantes sous la forme d'enzymes comme les superoxydes dismutases et les catalases et sous la forme de composés antioxydants. Mais ces défenses sont parfois inefficaces lors d'états pathologiques ce qui entraîne des dommages cellulaires. Ainsi les EOR ont été impliqués dans de nombreux processus pathologiques tels que les maladies cardiovasculaires, les processus inflammatoires et les maladies neurodégénératives.

Comme la surexpression des enzymes de détoxification protègent les cellules des effets délétères du stress oxydatif ainsi que, dans certains paradigmes, les animaux, ces enzymes ont été proposées comme outils thérapeutiques dans plusieurs pathologies (Ames et al., 1993 ; Gate et al., 1999 ; Ruef et al., 1999 ; Patel and Day, 1999).  
5 Néanmoins les résultats thérapeutiques sont limités, probablement du fait de la perméabilité limitée des cellules à ces molécules de grande taille. D'autres composés antioxydants tels les métalloporphyrines ont été développés et ont prouvé leur efficacité dans certains protocoles animaux (Patel and Day, 1999). Cependant, cette efficacité est très variable et ces composés ne passent pas la barrière hématoencéphalique. De plus,  
10 une des difficultés de mise en œuvre d'une détoxification directe des radicaux libres par surexpression d'enzymes de détoxification vient du fait que ces composants jouent aussi un rôle de second messenger dans la cellule où ils sont utilisés dans de nombreux processus normaux (Remacle et al., 1995 ; Morel et al., 1999).

Un autre type de stress impliqué dans de nombreuses maladies est le stress du réticulum endoplasmique (RE), qui a été très étudié chez la levure, où une voie génétique majeure, le stress UPR (unfolded protein response) a été mise en évidence (Kaufman, 1999). Le stress UPR est déclenché par la baisse du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RE, l'accumulation de protéines mal repliées ou la diminution du glucose.

La réponse au stress UPR induit la production de chaperonnes résidentes du RE, notamment GRP78 ou la calciréticuline. Chez l'homme, des altérations dans cette voie sont susceptibles de conduire à de nombreuses pathologies ; si ce stress est trop important, cela entraîne la mort de la cellule.

On a récemment mis en évidence l'implication du stress du réticulum endoplasmique dans les maladies neurodégénératives et la possibilité de les combattre par suractivation de la réponse UPR.  
25

Ainsi, il a été montré en culture de cellules que la réponse au stress UPR est réduite dans des mutants de la présélinine-1, qui correspondent aux plus fréquentes anomalies génétiques mises en évidence dans la maladie d'Alzheimer (Katayama et al., 1999). Par ailleurs des niveaux de GRP78 réduits sont observés dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, le niveau de GRP78 étant corrélé avec la  
30 sévérité de la pathologie. Enfin, dans un modèle de Drosophile de neurodégénérescence induite par une forme mutante poly-glutamine de la protéine humaine impliquée dans l'ataxie spinocérébelleuse de type 3, il a été montré in vivo que la surexpression de la

chaperonne HSP70 du RE provoque une forte réduction des phénotypes de neurodégénérescence (Warrick et al., 1999).

L'invention a pour objet de nouvelles protéines IP3 kinases et leurs séquences d'ADN correspondantes.

5 L'invention a également pour objet l'utilisation de protéines IP3 kinases, notamment dans le cadre de la résistance au stress oxydatif et au stress du réticulum endoplasmique.

L'invention a également pour objet l'utilisation de protéines IP3 dans le cadre du traitement des maladies neurodégénératives, notamment rétinienne.

10 L'invention a également pour objet l'utilisation des séquences d'ADN codant pour les protéines IP3 kinases pour l'obtention d'animaux transgéniques non humains surexprimant l'une des nouvelles protéines IP3 kinases.

L'invention a également pour objet l'utilisation des séquences d'ADN codant pour les protéines IP3 kinases pour l'obtention d'animaux transgéniques non humains, dans lesquels on a supprimé l'expression du gène codant pour l'une des nouvelles protéines IP3 kinases.

L'invention concerne l'utilisation de protéines comprenant ou constituées par :

– les séquences SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 7,

20 – ou toute séquence dérivée des séquences SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 7, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve qu'elle possède une activité IP3 kinase,

25 – toute séquence homologue des séquences SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 7, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 50% avec les régions comprises entre les acides aminés en position (159) à (441), (360) à (669), (187) à (461), (195) à (472) et (331) à (604) des séquences SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 7 respectivement, sous réserve qu'elle possède une activité IP3 kinase,

30 – ou tout fragment d'au moins environ 250 acides aminés contigus de l'une des séquences ci-dessus, sous réserve qu'il possède une activité IP3 kinase,

pour la préparation de médicaments destinés au traitement de maladies liées au stress oxydatif ou au stress du réticulum endoplasmique, ou de maladies neurodégénératives, notamment rétiniennes.

Par définition, on rappelle que les IP3 kinases sont des enzymes susceptibles de catalyser la réaction suivante :

ATP + 1D-myo-inositol 1,4,5 triphosphate  $\rightarrow$  ADP + 1D-myo-inositol 1,3,4,5 tetrakisphosphate

L'activité IP3 kinase d'une protéine peut être mesurée par le test fonctionnel de Takazawa et al. (1990).

La séquence SEQ ID NO : 2 est une nouvelle protéine isolée chez *Drosophila melanogaster*, notée DIP3K1.

La séquence SEQ ID NO : 4 est une nouvelle protéine isolée chez *Drosophila melanogaster*, notée DIP3K2.

La séquence SEQ ID NO : 5 est la protéine humaine IP3K-A.

La séquence SEQ ID NO : 6 est la protéine humaine IP3K-B.

La séquence SEQ ID NO : 7 est la protéine humaine IP3K-C.

L'invention concerne une protéine caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence SEQ ID NO : 2,

- ou toute séquence dérivée de SEQ ID NO : 2, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, possédant une activité IP3 kinase,

- toute séquence homologue de SEQ ID NO : 2, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 65 % avec la région comprise entre les acides aminés en position (159) et (441) de la séquence SEQ ID NO : 2 et possédant une activité IP3 kinase,

- ou tout fragment d'une des séquences définies ci-dessus, sous réserve qu'il possède une activité IP3 kinase, notamment tout fragment étant constitué d'au moins environ 250 acides aminés contigus de la séquence SEQ ID NO : 2.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, la protéine de l'invention, telle que définie ci-dessus, est caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par la séquence SEQ ID NO : 2.

L'invention concerne également une protéine caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence SEQ ID NO : 4,
- ou toute séquence dérivée de SEQ ID NO : 4, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, possédant une activité IP3 kinase,
- toute séquence homologue de SEQ ID NO : 4, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 71 % avec la région comprise entre les acides aminés en position (360) et (669) de la séquence SEQ ID NO : 4 et possédant une activité IP3 kinase,
- ou tout fragment d'une des séquences définies ci-dessus, sous réserve qu'il possède une activité IP3 kinase, notamment tout fragment constitué d'au moins environ 250 acides aminés contigus de la séquence SEQ ID NO : 4, le fragment de la séquence SEQ ID NO : 4, délimité de l'acide aminé en position (289) à l'acide aminé en position (669) étant exclu.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, la protéine de l'invention, telle que définie ci-dessus, est caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par la séquence SEQ ID NO : 4.

L'invention concerne des fragments de protéines telles que définies ci-dessus choisis parmi les séquences délimitées :

- de l'acide aminé en position (159) à l'acide aminé en position (441) de la séquence SEQ ID NO : 2,
- de l'acide aminé en position (360) à l'acide aminé en position (669) de la séquence SEQ ID NO : 4,
- de l'acide aminé en position (187) à l'acide aminé en position (461) de la séquence SEQ ID NO : 5,
- de l'acide aminé en position (195) à l'acide aminé en position (472) de la séquence SEQ ID NO : 6,
- de l'acide aminé en position (331) à l'acide aminé en position (604) de la séquence SEQ ID NO : 7.

L'invention concerne une séquence nucléotidique codant pour l'une des protéines telles que définies ci-dessus.

Une séquence d'ADN avantageuse de l'invention comprend ou est constituée par :



– la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1,  
– ou toute séquence nucléotidique dérivée, par dégénérescence du code génétique, de la séquence SEQ ID NO : 1 codant pour une protéine représentée par la séquence SEQ ID NO : 2,

5           – ou toute séquence nucléotidique dérivée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, de la séquence SEQ ID NO : 1 codant pour une protéine dérivée de la séquence SEQ ID NO : 2 possédant une activité IP3 kinase,

10           – ou toute séquence nucléotidique homologue de la séquence SEQ ID NO : 1, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 50% avec 700 nucléotides contigus situés dans le domaine délimité du nucléotide en position (1425) au nucléotide en position (3969) de la séquence SEQ ID NO : 1, codant pour une protéine homologue de la séquence SEQ ID NO : 2 et possédant une activité IP3 kinase,

15           – ou tout fragment de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 ou des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 700 nucléotides contigus situés dans le domaine délimité au nucléotide en position (1425) au nucléotide en position (3969) de ladite séquence et codant pour une protéine qui possède une activité IP3 kinase,

20           – ou toute séquence nucléotidique complémentaire des séquences ou fragments susmentionnés,

            – ou toute séquence nucléotidique susceptible d'hybrider dans des conditions stringentes avec la séquence complémentaire de l'une des séquences ou de l'un des fragments susmentionnés.

Par conditions stringentes d'hybridation on entend par exemple :

- 25           – température d'hybridation : 42°C,  
            – milieu d'hybridation : 5X SSC, 50% formamide, 5X Denhardt, 0,1% de sodium dodécyl sulfate (SDS),  
            – température de lavage : 42°C,  
            – milieu de lavage : 0,1 X SSC (15 mM NaCl ; 1,5 mM citrate de sodium), 0,1%  
30           SDS.

Une autre séquence d'ADN avantageuse de l'invention comprend ou est constituée par :

- la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 3,

– ou toute séquence nucléotidique dérivée, par dégénérescence du code génétique, de la séquence SEQ ID NO : 3 codant pour une protéine représentée par la séquence SEQ ID NO : 4,

– ou toute séquence nucléotidique dérivée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, de la séquence SEQ ID NO : 3 codant pour une protéine dérivée de la séquence SEQ ID NO : 4 possédant une activité IP3 kinase,

– ou toute séquence nucléotidique homologue de la séquence SEQ ID NO : 3, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 50% avec 700 nucléotides contigus situés dans le domaine délimité du nucléotide en position (3234) au nucléotide en position (6021) de la séquence SEQ ID NO : 3, codant pour une protéine homologue de la séquence SEQ ID NO : 4 et possédant une activité IP3 kinase,

– ou tout fragment de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 3 ou des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 700 nucléotides contigus situés dans le domaine délimité au nucléotide en position (3234) au nucléotide en position (6021) de ladite séquence et codant pour une protéine qui possède une activité IP3 kinase,

– ou toute séquence nucléotidique complémentaire des séquences ou fragments susmentionnés,

– ou toute séquence nucléotidique susceptible d'hybrider dans des conditions stringentes avec la séquence complémentaire de l'une des séquences ou de l'un des fragments susmentionnés.

L'invention concerne un vecteur recombinant, notamment plasmide, cosmide, phage ou ADN de virus, contenant l'une des séquences nucléotidiques telles que mentionnées ci-dessus.

L'invention concerne également un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus, contenant les éléments nécessaires à l'expression dans une cellule hôte des polypeptides codés par les acides nucléiques tels que définis ci-dessus, insérés dans ledit vecteur.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, le vecteur recombinant défini ci-dessus contient notamment un promoteur reconnu par l'ARN polymérase de la cellule hôte, en particulier un promoteur inductible et éventuellement une séquence de transcription, de terminaison, et éventuellement une séquence signal et/ou d'ancrage.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, le vecteur recombinant, tel que défini ci-dessus, contient les éléments qui permettent l'expression d'une séquence nucléotidique, telle que définie ci-dessus, en tant que protéine mature ou protéine de fusion.

5 L'invention concerne également une cellule hôte, choisie notamment parmi les bactéries, les virus, les levures, les champignons, les plantes ou les cellules de mammifères, ladite cellule hôte étant transformée, notamment à l'aide d'un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus.

10 Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, la cellule hôte, telle que définie ci-dessus, contient les éléments de régulation permettant l'expression de la séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus.

L'invention concerne également le produit de l'expression d'un acide nucléique exprimé par une cellule hôte transformée telle que définie ci-dessus.

15 L'invention concerne également un anticorps caractérisé en ce qu'il est dirigé de manière spécifique contre une protéine de l'invention.

20 On ne se limite pas aux anticorps polyclonaux ; l'invention concerne également tout anticorps monoclonal produit par tout hybridome susceptible d'être formé selon les méthodes classiques à partir, d'une part, de cellules de rate d'animaux, en particulier de souris ou de rat, les cellules de l'animal étant immunisées contre la protéine de l'invention, et d'autre part de cellules d'une lignée cellulaire de myélome, ledit hybridome étant susceptible d'être choisi selon la capacité de la lignée cellulaire à produire des anticorps monoclonaux reconnaissant la protéine utilisée au préalable pour l'immunisation des animaux.

25 L'invention concerne également une sonde nucléotidique capable d'hybrider avec l'une quelconque des séquences nucléiques de l'invention.

L'invention concerne également les oligonucléotides antisens ou ARN messenger antisens dérivés des séquences nucléotidiques tels que définis ci-dessus.

30 L'invention concerne également une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend une protéine ou un fragment de protéine tels que définis ci-dessus et un vecteur pharmaceutique acceptable.

Une composition pharmaceutique avantageuse de l'invention comprend l'une des nouvelles protéines ou un fragment d'une des nouvelles protéines tels que définis ci-dessus et un vecteur pharmaceutique acceptable.

Une autre composition pharmaceutique avantageuse de l'invention comprend l'une des protéines ou un fragment d'une des protéines déjà connues tels que définis ci-dessus et un vecteur pharmaceutique acceptable.

5 L'invention concerne également l'utilisation de l'une des protéines telles que définies ci-dessus pour la préparation de médicaments destinés au traitement de maladies liées au stress oxydatif.

Les pathologies concernées sont par exemple des infections chroniques comme l'arthrite ou certaines formes de cancers.

10 L'invention concerne également l'utilisation de l'une des protéines telles que définies ci-dessus pour la préparation de médicaments destinés au traitement de maladies liées au stress du réticulum endoplasmique.

Parmi les pathologies concernées, on peut citer comme exemples la fibrose cystique et la maladie d'Alzheimer.

15 L'invention concerne également l'utilisation de l'une des protéines telles que définies ci-dessus pour la préparation de médicaments destinés au traitement de maladies neurodégénératives, notamment rétinienne.

Parmi les pathologies concernées, on peut citer comme exemples la maladie d'Alzheimer et la chorée de Huntington ainsi que les rétinopathies pigmentaires.

20 L'invention concerne également des cellules animales qui contiennent, dans leur génome, l'une des séquences nucléotidiques de l'invention.

L'invention concerne également un animal transgénique non humain contenant des cellules telles que définies ci-dessus, et qui surexprime l'une des protéines de l'invention.

25 En jouant non pas sur le niveau des radicaux libres dans la cellule mais sur les conséquences néfastes qu'ils entraînent, la surexpression de l'activité IP3K protège la cellule sans altérer l'homéostasie des radicaux libres dans la cellule qui peut être importante pour son fonctionnement normal.

30 L'invention concerne également un animal transgénique non humain contenant des cellules telles que définies ci-dessus, dans lequel l'expression du gène, codant pour l'une des protéines de l'invention, est supprimée.

Un tel mutant, obtenu par excision imprécise du transposon (un morceau d'ADN génomique est en même temps enlevé) permet de connaître les phénotypes associés à une perte complète du gène. Si son absence s'avère létale, la génération de clones somatiques permet de tester les conséquences de la perte totale de DIP3K1 dans les

différents tissus de l'organisme, y compris dans les tissus nerveux où l'insertion UY530 est associée à de la neurodégénérescence.

## DESCRIPTION DES FIGURES

Les Figures 1A et 1B représentent la résistance au stress oxydatif de mâles (figure 1A) et de femelles (figure 1B) de contrôle (génotype daGAL4/+) ou surexprimant l'IP3K (génotype UY530/+ ; daGAL4/+) sur un milieu de concentration 1% en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. On a représenté le pourcentage de survie en fonction du temps, exprimé en heures. La courbe avec les losanges correspond aux mouches de contrôle et la courbe avec les carrés correspond aux mouches qui surexpriment l'IP3 kinase.

Les Figures 1C et 1D représentent la résistance au stress oxydatif de mâles (figure 1C) et de femelles (figure 1D) de contrôle (génotype daGAL4/+) ou surexprimant l'IP3K (génotype UY530/+ ; daGAL4/+) sur un milieu de concentration 3% en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. On a représenté le pourcentage de survie en fonction du temps, exprimé en heures. La courbe avec les losanges correspond aux mouches de contrôle et la courbe avec les carrés correspond aux mouches qui surexpriment l'IP3 kinase.

Les Figures 1E et 1F représentent la résistance au stress oxydatif de mâles (figure 1E) et de femelles (figure 1F) de contrôle (génotype daGAL4/+) ou surexprimant l'IP3K (génotype UY530/+ ; daGAL4/+) sur un milieu de concentration 5% en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. On a représenté le pourcentage de survie en fonction du temps, exprimé en heures. La courbe avec les losanges correspond aux mouches de contrôle et la courbe avec les carrés correspond aux mouches qui surexpriment l'IP3 kinase.

La Figure 2 représente le temps de développement avant l'émergence à 26°C. On compare le pourcentage de mouches émergées de différents génotypes en fonction du temps, exprimé en heures. La courbe avec les carrés noirs concerne les mouches femelles témoins de génotype daGAL4/+, la courbe avec les ronds noirs concerne les mouches mâles témoins de génotype daGAL4/+, la courbe avec les carrés blancs concerne les mouches femelles de génotype UY530/+ ; daGAL4/+ et la courbe avec les ronds blancs concerne les mouches mâles de génotype UY530/+ ; daGAL4/+.

La Figure 3A représente la résistance au stress oxydatif induit par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. On a étudié chez des mouches de génotypes divers le pourcentage de survie sur un milieu contenant 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fonction du temps en heures. La courbe avec les losanges

noirs concerne les mouches possédant une seule dose du récepteur IP3R (génotype *itpr1664/+*) ; la courbe avec les ronds noirs concerne les mouches qui surexpriment DIP3K1 (génotype *UY530/+ ; daGAL4/+*) ; la courbe avec les carrés noirs concerne les mouches de contrôle (génotype *daGAL4/+*) ; la courbe avec les triangles noirs concerne les mouches homozygotes pour l'insertion dans DIP3K1 (génotype *UY530/UY530*).

La Figure 3B représente la résistance au stress UPR induit par la tunicamycine. On a étudié chez des mouches de génotypes divers le pourcentage de survie sur un milieu contenant 3  $\mu$ M de tunicamycine en fonction du temps en heures. La courbe avec les losanges noirs concerne les mouches possédant une seule dose du récepteur IP3R (génotype *itpr1664/+*) ; la courbe avec les ronds noirs concerne les mouches qui surexpriment DIP3K1 (génotype *UY530/+ ; daGAL4/+*) ; la courbe avec les carrés noirs concerne les mouches de contrôle (génotype *daGAL4/+*) ; la courbe avec les triangles noirs concerne les mouches homozygotes pour l'insertion dans DIP3K1 (génotype *UY530/UY530*).

La Figure 4 représente la réduction de la longévité dans la souche homozygote pour l'insertion UY530 au début de l'unité transcriptionnelle de DIP3K. On a représenté le pourcentage de survie en fonction du temps en jours. Indiscernable du contrôle jusqu'à 19 jours le taux de survie de *UY530/UY530* chute ensuite brutalement. Ceci est associé à une neurodégénérescence rétinienne. La courbe en pointillés concerne les mouches de contrôle (génotype *daGAL4/+*) et la courbe en trait plein concerne les mouches de la lignée *UY530/UY530*.

La Figure 5 concerne la comparaison des lobes optiques sur des mouches de 25 à 27 jours de génotype *daGAL4/+* (A, C) ou *UY530/UY530* (B, D). Des vacuoles caractéristiques de dégénérescence neuronale, dont le nombre augmente avec l'âge, sont clairement visibles dans les lobes optiques des mouches homozygotes pour UY530.

## MATERIEL ET METHODES

### Différentes lignées mutantes utilisées

On a utilisé des lignées déjà connues qui sont :

- **W ; da-GAL4** : lignée d'expression de la protéine GAL4 sous la dépendance du promoteur ubiquitaire du gène daughterless (Wodarz et al., 1995).
- **Itpr<sup>P1664</sup>/TM3** : insertion hypomorphe du récepteur à l'IP3 (Venkatesh and Hasan, 1997). Cette lignée a été utilisée dans des tests de résistance après croisement avec une lignée w de référence pour donner des individus *itpr<sup>P1664</sup>/+*.

On a également utilisé les nouvelles lignées mutantes suivantes :

- **yw ; pP{Mae-UAS.6.11}<sup>UY530</sup>**, qui est obtenue par l'insertion du transposon pP{Mae-UAS.6.11} 3 paires de bases en aval du début de l'unité de transcription correspondant de l'ADNc SD07279 codant pour la protéine D-IP3K1 (lignée notée UY530 dans le texte)
- **yw ; pP{Mae-UAS.6.11}<sup>UY530R2</sup>**, **yw ; pP{Mae-UAS.6.11}<sup>UY530R16</sup>**, **yw ; pP{Mae-UAS.6.11}<sup>UY530R21</sup>**, obtenues à la suite d'excisions exactes (sans délétions chromosomiques adjacentes) du transposon pP{Mae-UAS.6.11}<sup>UY530</sup> (lignées notées UY530R2, UY530R16, UY530R21 dans le texte)
- **W ; PUASt-D-IP3K1-10A**, **W ; PUASt-D-IP3K1-32**, **W ; PUASt-D-IP3K1-37**, qui sont des souches transgéniques permettant la surexpression de la protéine D-IP3K1.

### Mutagenèse

La mutagenèse a été effectuée à partir d'un transposon pP{Mae-UAS.6.11} comprenant des séquences UAS et le gène marqueur yellow (y) donné par J. Merriam (Merriam, 1997). Des femelles de génotype yw, pP{Mae-UAS.6.11} sont croisées avec des mâles de génotype w ; Δ23, Sb/TM6. Les mâles descendants yw, pP{Mae-UAS.6.11} ; +/Δ23, Sb sont croisés en tubes individuels avec des femelles yw. Dans la descendance les mâles de phénotype {y+, Sb+} qui correspondent à des événements de transposition indépendants sur un des deux autosomes sont sélectionnés et croisés

individuellement avec des femelles yw avant de balancer le chromosome portant l'insertion selon des techniques standards. Les lignées résultantes, de génotype yw ; pP{Mae-UAS.6.11}<sup>UYN</sup> (N désignant le numéro de la lignée) sont notées yw ; UYN dans ce qui suit par mesure de simplicité.

#### Identification du point d'insertion du transposon UY530

L'ADN des mouches de la lignée yw; UY530 est extrait, digéré par l'enzyme Msp1 puis, après précipitation, le produit de cette digestion est ligué avec une ligase T4 et 2 µl utilisé pour une amplification par PCR avec les amorces OUY52 (ACACAACCTTTCCTCTCAACAA) et OUY31 (ATTGATTCACTTTAACTTGCAC) qui sont contenus dans le transposon. Le fragment résultant est séquencé et la séquence comparée avec la séquence génomique de la Drosophile par le programme BLAST, permettant la localisation du point d'insertion du transposon et l'identification du gène D-IP3K1 adjacent.

#### Excision du transposon

Des femelles de génotype yw, UY530 sont croisées avec des mâles de génotype w ; CyO/+ ; Δ23, Sb/+. Les mâles descendants yw, UY530/CyO ; +/Δ23, Sb sont croisés en tubes individuels avec des femelles yw ; CyO/Sp. Dans la descendance les mâles de phénotype {y, w, Cy, Sb+, Sp+} qui correspondent à des événements potentiels indépendants d'excision du transposon sont sélectionnés et croisés individuellement avec des femelles yw ; CyO/Sp pour établir les lignées révertantes notées UY530Ri (i = 2, 16, 21). Pour confirmer le type d'événement de réversion, l'ADN des mouches de chaque lignée révertante est alors extrait et utilisé pour une analyse par PCR et en vue d'un séquençage de la région d'insertion du transposon selon des techniques standards.

#### Obtention de lignées transgéniques de surexpression de l'IP3K1

Un fragment EcoRI-Xho1 isolé du cDNA SD07279 a été cloné dans le vecteur PUASt (Brand and Perrimon, 1993) et l'ADN résultant utilisé avec l'ADN d'un vecteur contenant la transposase Δ23 pour obtenir des lignées transgéniques selon des



techniques standards. Trois lignées indépendantes ont été ainsi obtenues notées W ; PUASt-D-IP3K1-i ( i=10A, 32, 37).

#### Tests de résistance

5

Les mouches de même sexe âgées de 3 à 5 jours sont placées par groupes de 30 dans un tube de 50 ml contenant un milieu solide composé de 1,3% d'agarose à bas point de fusion, 1% de sucrose et du produit à tester pour la résistance (1% de peroxyde d'hydrogène ou 5mM de paraquat (produit Sigma) ou 3  $\mu$ M de tunicamycine (produit Sigma) selon le test effectué). Les tubes sont maintenus à 26°C et les mouches mortes sont comptées 2 fois par jour pour établir les courbes de survie.

10

#### Test de longévité

15

Pour chaque génotype les mâles nouveaux nés sont placés par groupes de 30 dans un tube de 50 ml maintenus à 26°C. Les mouches sont transférées tous les 2 ou 3 jours dans des tubes frais et les morts sont comptés à cette occasion pour établir les courbes de survie. Un minimum de 5 tubes indépendants sont utilisés pour s'assurer de la validité statistique des écarts observés.

20

**RESULTATS****Tableau 1 (Figure 1A)**

Pourcentage de survie de *Drosophiles* mâles de génotype daGAL4/+ (mouches de contrôle) ou de génotype UY530/+ ; da-GAL4/+ sur un milieu contenant 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

temps (heures)	% de survie des <i>Drosophiles</i>	
	génotype daGAL4/+	génotype UY530/+ ; daGAL4/+
0	100	100
39	98	98
51	92	98
66	43	96
75	18	91
88	1	69
97	0	53
118	0	29
138	0	20
160	0	11
182	0	7
256	0	4
289	0	2

Les moyennes sont établies selon les formules standards à partir d'un minimum de trois tubes de trente mouches.

On constate une forte protection contre le stress oxydant induit par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des individus mâles de génotype UY530/+ ; daGAL4/+ surexprimant DIP3K1 par rapport aux individus de contrôle de génotype daGAL4/+. Ainsi, par exemple, après 88 heures passées sur le milieu à 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seul 1% des individus de contrôle restent vivants contre 69% des individus surexprimant DIP3K1.

**Tableau 2 (Figure 1B)**

Pourcentage de survie de *Drosophiles* femelles de génotype daGAL4/+ (mouches de contrôle) ou de génotype UY530/+ ; da-GAL4/+ sur un milieu contenant 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

temps (heures)	% de survie des <i>Drosophiles</i>	
	génotype daGAL4/+	génotype UY530/+ ; daGAL4/+
0	100	100
39	97	93
51	88	92
66	74	91
75	60	91
88	27	88
97	14	85
118	1	66
138	0	48
160	0	32
182	0	23
256	0	11
289	0	5

Les moyennes sont établies selon les formules standards à partir d'un minimum de trois tubes de trente mouches.

On constate une forte protection contre le stress oxydant induit par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des individus femelles de génotype UY530/+ ; daGAL4/+ surexprimant DIP3K1 par rapport aux individus de contrôle de génotype daGAL4/+. Ainsi, par exemple, après 118 heures passées sur le milieu à 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seul 1% des individus de contrôle restent vivants contre 66% des individus surexprimant DIP3K1.

**Tableau 3 (Figure 1C)**

Pourcentage de survie de *Drosophiles* mâles de génotype daGAL4/+ (mouches de contrôle) ou de génotype UY530/+ ; da-GAL4/+ sur un milieu contenant 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

temps (heures)	% de survie des <i>Drosophiles</i>	
	génotype daGAL4/+	génotype UY530/+ ; daGAL4/+
0	100	100
39	94	98
51	46	98
66	5	84
75	1	55
88	0	30
97	0	21
118	0	4
138	0	1
160	0	0
182	0	0
256	0	0
289	0	0

Les moyennes sont établies selon les formules standards à partir d'un minimum de trois tubes de trente mouches.

On constate une forte protection contre le stress oxydant induit par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des individus mâles de génotype UY530/+ ; daGAL4/+ surexprimant DIP3K1 par rapport aux individus de contrôle de génotype daGAL4/+. Ainsi, par exemple, après 75 heures passées sur le milieu à 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seul 1% des individus de contrôle restent vivants contre 55% des individus surexprimant DIP3K1.

**Tableau 4 (Figure 1D)**

**Pourcentage de survie de Drosophiles femelles de génotype daGAL4/+ (mouches de contrôle) ou de génotype UY530/+ ; da-GAL4/+ sur un milieu contenant 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

temps (heures)	% de survie des Drosophiles	
	génotype daGAL4/+	génotype UY530/+ ; daGAL4/+
0	100	100
39	81	93
51	68	92
66	22	85
75	2	81
88	0	74
97	0	59
118	0	49
138	0	45
160	0	2
182	0	0
256	0	0
289	0	0

Les moyennes sont établies selon les formules standards à partir d'un minimum de trois tubes de trente mouches.

On constate une forte protection contre le stress oxydant induit par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des individus femelles de génotype UY530/+ ; daGAL4/+ surexprimant DIP3K1 par rapport aux individus de contrôle de génotype daGAL4/+. Ainsi, par exemple, après 88 heures passées sur le milieu à 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, il ne reste plus d'individus de contrôle alors que 74% des individus surexprimant DIP3K1 restent vivants.

**Tableau 5 (Figure 1E)**

Pourcentage de survie de *Drosophiles* mâles de génotype daGAL4/+ (mouches de contrôle) ou de génotype UY530/+ ; da-GAL4/+ sur un milieu contenant 5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

temps (heures)	% de survie des <i>Drosophiles</i>	
	génotype daGAL4/+	génotype UY530/+ ; daGAL4/+
0	100	100
39	92	97
51	26	87
66	1	17
75	0	7
88	0	3
97	0	0
118	0	0
138	0	0
160	0	0
182	0	0
256	0	0
289	0	0

Les moyennes sont établies selon les formules standards à partir de deux tubes de trente mouches.

On constate une forte protection contre le stress oxydant induit par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des individus mâles de génotype UY530/+ ; daGAL4/+ surexprimant DIP3K1 par rapport aux individus de contrôle de génotype daGAL4/+. Ainsi, par exemple, après 66 heures passées sur le milieu à 5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seul 1% des individus de contrôle restent vivants contre 17% des individus surexprimant DIP3K1.

**Tableau 6 (Figure 1F)**

**Pourcentage de survie de Drosophiles femelles de génotype daGAL4/+ (mouches de contrôle) ou de génotype UY530/+ ; da-GAL4/+ sur un milieu contenant 5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

temps (heures)	% de survie des Drosophiles	
	génotype daGAL4/+	génotype UY530/+ ; daGAL4/+
0	100	100
39	75	95
51	46	92
66	16	85
75	2	76
88	0	51
97	0	29
118	0	7
138	0	5
160	0	0
182	0	0
256	0	0
289	0	0

Les moyennes sont établies selon les formules standards à partir d'un minimum de trois tubes de trente mouches.

On constate une forte protection contre le stress oxydant induit par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des individus femelles de génotype UY530/+ ; daGAL4/+ surexprimant DIP3K1 par rapport aux individus de contrôle de génotype daGAL4/+. Ainsi, par exemple, après 75 heures passées sur le milieu à 5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seuls 2% des individus de contrôle restent vivants contre 76% des individus surexprimant DIP3K1.

**Tableau 7 (figure 2)**

**Comparaison des pourcentages de mouches émergées de différents génotypes en fonction du temps exprimé en heures**

5

temps (h)	% de Drosophiles émergées de différents génotypes			
	Drosophiles mâles		Drosophiles femelles	
	daGAL4/+	UY530/+ ; daGAL4/+	daGAL4/+	UY530/+ ; daGAL4/+
200	0	0	0	0
208	7	0	11	0
210	17	0	34	0
213	33	0	71	4
214	40	0	75	8
217	58	5	80	22
218	59	8	81	24
219	81	8	90	48
221	83	32	91	60
223	88	38	93	78
234	88	41	94	82
237	89	60	94	84
238	91	60	97	84
239	98	94	100	94
240	98	95	100	94
243	99	95	100	94
267	99	95	100	94
270	99	97	100	98
272	100	100	100	100

A 26°C, on constate un retard important d'émergence des individus mâles et femelles de génotype UY530/+ ; daGAL4/+ surexprimant DIP3K1 par rapport aux individus de contrôle de génotype daGAL4/+. Ainsi, par exemple, après 219 heures



passées depuis la ponte des œufs, 81% des individus mâles de contrôle ont émergé contre 8% des individus surexprimant DIP3K1.

**Tableau 8 (figure 3A)**

Pourcentage de survie en fonction du temps exprimé en heures de *Drosophiles* mâles de génotype daGAL4/+ (mouches de contrôle), de génotype UY530/+ ; daGAL4/+, de génotype UY530/UY530 et de génotype itpr1664/+ sur un milieu contenant 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

temps (heures)	% de survie des <i>Drosophiles</i> de différents génotypes			
	daGAL4/+	UY530/+ ; daGAL4/+	UY530/UY530	itpr1664/+
0,0	100	100	100	100
38,0	86	95	88	98
46,0	83	92	68	98
62	53	86	37	94
70,7	35	74	24	85
86,0	3	33	2	40
95,5	1	12	0	19
110,0	0	1	0	4
118,5	0	0	0	2
134,8	0	0	0	2
143,3	0	0	0	2
162,0	0	0	0	2

Les moyennes sont établies selon les formules standards à partir d'un minimum de 3 tubes de trente mouches.

On constate une forte protection contre le stress oxydant induit par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des mâles de génotype UY530/+ ; daGAL4/+ surexprimant DIP3K1 ou de génotype itpr1664/+ ayant une réduction du niveau du récepteur IP3R par rapport aux individus

de contrôle de génotype daGAL4/+. Ainsi, par exemple, après 86 heures passées sur le milieu à 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seuls 3% des individus de contrôle restent vivants contre 33% des individus surexprimant DIP3K1 et 40% des individus sousexprimant IP3R. La lignée homozygote UY530/UY530 est de façon reproductible plus sensible que la lignée témoin au stress oxydant induit par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **Tableau 9 (figure 3B)**

Pourcentage de survie en fonction du temps exprimé en heures de Drosophiles mâles de génotype daGAL4/+ (mouches de contrôle), de génotype UY530/+ ; daGAL4/+, de génotype UY530/UY530 et de génotype itpr1664/+ sur un milieu contenant de la tunicamycine à une concentration de 3 µM

	% de survie des Drosophiles de différents génotypes			
temps (heures)	daGAL4/+	UY530/+ ; daGAL4/+	UY530/UY530	itpr1664/+
0,0	100	100	100	100
38,0	93	97	98	100
46,0	91	94	98	100
62	67	84	76	100
70,7	56	75	66	100
86,0	37	60	36	100
95,5	20	40	17	98
110,0	2	12	1	52
118,5	0	2	0	18
134,8	0	1	0	0
143,3	0	0	0	0
162,0	0	0	0	0

Les moyennes sont établies selon les formules standards à partir d'un minimum de 3 tubes de trente mouches.

On constate une forte protection contre le stress UPR induit par la tunicamycine des mâles de génotype UY530/+ ; daGAL4/+ surexprimant DIP3K1 ou de génotype itpr1664/+ ayant une réduction du niveau du récepteur IP3R par rapport aux individus de contrôle de génotype daGAL4/+. Ainsi, par exemple, après 95,5 heures passées sur le milieu à 3  $\mu$ M de tunicamycine, seuls 20% des individus de contrôle restent vivants contre 40% des individus surexprimant DIP3K1 et 98% des individus sousexprimant IP3R.

**Tableau 10 (figure 4)**

**Pourcentage de survie à 26°C de Drosophiles mâles de génotype daGAL4/+ et de génotype UY530/UY530 en fonction du temps exprimé en jours sur un milieu standard**

temps (jours)	% de survie des Drosophiles	
	génotype da-GAL4/+	génotype UY530/UY530
0	100	100
1	100	100
2	100	99
3	100	98
4	98	98
5	97	97
6	97	97
7	97	96
8	96	94
9	95	94
10	95	94
11	95	94
12	94	94
13	94	93
14	94	93
15	93	91
16	92	89
17	90	89
18	90	88
19	90	86

20	89	83
21	88	79
22	87	76
23	87	70
24	86	63
25	85	54
26	85	47
27	83	40
28	81	33
29	79	26
30	78	20
31	78	17
32	77	14
33	76	12
34	75	9
35	74	7
36	73	6
37	72	5
38	72	5
39	70	3
40	68	3
41	65	2
42	64	2
43	61	2
44	58	1
45	56	0
46	52	0
47	48	0
48	44	0
49	40	0
50	37	0
51	35	0
52	34	0
53	32	0
54	30	0
55	27	0
56	24	0

57	19	0
58	17	0
59	15	0
60	13	0
61	10	0
62	9	0
63	8	0
64	7	0
65	6	0
66	6	0
67	4	0
68	4	0
69	3	0
70	2	0
71	2	0
72	2	0
73	2	0
74	2	0
75	1	0
76	1	0
77	1	0
78	1	0
79	1	0
80	0	0

Les moyennes sont établies selon les formules standards à partir de sept tubes de trente mouches.

On constate une forte réduction de la longévité des mâles de génotype UY530/UY530 par rapport aux individus de contrôle de génotype daGAL4/+. Ainsi, par exemple, après 26 jours, moins de la moitié des individus de génotype UY530/UY530 restent en vie contre 85% des individus de contrôle. Au bout de 45 jours, lorsque tous les individus de génotype UY530/UY530 sont morts, il reste encore plus de la moitié des individus de contrôle. Il faut également noter que jusqu'à 18 jours, les taux de survie sont statistiquement indiscernables, ce qui suggère que les individus de génotype UY530/UY530 ne présentent pas un taux de mortalité initial particulièrement élevé.

## REFERENCES

- 5       – Ames et al., Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of ageing, *PNAS* (1993) **90**, 7915-7922,
- Brand, A. and Perrimon, N., Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* (1993) **118**, 401-415,
- Clandinin et al., Inositol triphosphate mediates a RAS independent response to LET-23 receptor tyrosine kinase activation in *C.elegans*, *Cell* (1998) **92**, 523-533,
- 10      – Communi et al., Calcium calmodulin dependent protein kinase 2 and protein kinase C mediated phosphorylation and activation of D-myo-inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase B in astrocytes, *J. Biol. Chem.* (1999) **274**, 14734-14742,
- Communi et al., D-myo-inositol triphosphate 3-kinase A is activated by receptor activation through a calcium calmodulin dependent protein kinase II phosphorylation mechanism, *Embo J.* (1997) **16**, 1943-1952,
- 15      – Communi et al., Purification and biochemical properties of a high-molecular-mass inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase isoenzyme in human platelets, *Biochem. J.* (1994) Mar 15 ; 298 Pt 3 : 669-73,
- Fukuda et al., The function of inositol high polyphosphate binding proteins, *BioEssays* (1997) **19**, 593-603,
- 20      – Gate et al., Oxidative stress induced in pathologies : the role of antioxidants, *Biomed Pharmacother* (1999) **53**(4), 169-180,
- Irvine et al., Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate as a second messenger – a special role in neurones ? *Chem. Phys. Lipids* (1999) **98**, 49-57,
- 25      – Jun et al., Enhanced hippocampal CA1 LTP but normal spatial learning in Inositol 1,4,5-triphosphate3-kinaseA-deficient mice, *Learning and Memory* (1998) **5**, 317-330,
- Katayama et al., Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded protein response, *Nature Cell Biol.* (1999) **1**, 479-485,
- 30      – Kaufman R., Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum : coordination of gene transcriptional and translational controls, *Genes Dev.* (1999) **13**, 1211-1233,

- Lenaz G., Role of mitochondria in oxidative stress and ageing, *Bioch. Biophys. Acta* (1998) **1366**, 53-67,
- Merriam, 1997 : 1997.5.9 Personal communication to FlyBase available from [http://flybase.bio.indiana.edu/.bin/fbpcq.html\\_FBrf0093303](http://flybase.bio.indiana.edu/.bin/fbpcq.html_FBrf0093303)),
- 5 – Morel et al., Repression of gene expression by oxidative stress, *Biochem. J.* (1999) 481-496,
- Patel and Day, Metalloporphyrin class of therapeutic catalytic antioxidants, *Trends Pharmacol. Sci.* (1999) **20**, 359-364,
- Patel et al., Molecular properties of inositol 1,4,5 triphosphate receptors, *Cell Calcium* (1999) **25**, 247-264,
- 10 – Remacle et al., Low levels of reactive oxygen species as modulators of cell function, *Mut. Res.* (1995) **316**, 103-122,
- Ruef et al., Oxidative stress and atherosclerosis : its relationship to growth factors, thrombus formation and therapeutic approaches, *Thromb Haemost* (1999) **82** Suppl 1 : 32-7,
- 15 – Soriano et al., Membrane association, localization and topology of rat inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase B : implications for membrane traffic and  $Ca^{2+}$  homoeostasis, *Biochem. J.* (1997) **324**, 579-589,
- Takazawa et al., *Biochem J.* (1990) **268**, 213-217,
- 20 – Takazawa et al., Molecular cloning and expression of a human brain inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1991) **174**, 529-535,
- Takazawa et al., Molecular cloning and expression of a new putative inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase isoenzyme, *Biochem. J.* (1991) **278**, 883-886,
- Venkatesh, K. and Hasan, G., Disruption of the IP3 receptor gene of drosophila affects larval metamorphosis and ecdysone release. *Curr. Biol.* (1997) **7**, 500-509,
- 25 – Warrick et al., Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in *Drosophila* by the molecular chaperone HSP70, *Nat. Genet.* (1999) **23**, 425-428,
- Wodarz et al., Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell* (1995) **82**, 67-76.

**REVENDICATIONS****1.** Utilisation de protéines comprenant ou constituées par :

– les séquences SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 7,

– ou toute séquence dérivée des séquences SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 7, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve qu'elle possède une activité IP3 kinase,

– toute séquence homologue des séquences SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 7, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 50% avec les régions comprises entre les acides aminés en position (159) à (441), (360) à (669), (187) à (461), (195) à (472) et (331) à (604) des séquences SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 7 respectivement, sous réserve qu'elle possède une activité IP3 kinase,

– ou tout fragment d'au moins environ 250 acides aminés contigus de l'une des séquences ci-dessus, sous réserve qu'il possède une activité IP3 kinase,

pour la préparation de médicaments destinés au traitement de maladies liées au stress oxydatif ou au stress du réticulum endoplasmique, ou de maladies neurodégénératives, notamment rétinienes.

**2.** Protéine caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

– la séquence SEQ ID NO : 2,

– ou toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 2, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, possédant une activité IP3 kinase,

– toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 2, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 65 % avec la région comprise entre les acides aminés en position (159) et (441) de la séquence SEQ ID NO : 2 et possédant une activité IP3 kinase,



– ou tout fragment d'une des séquences définies ci-dessus, sous réserve qu'il possède une activité IP3 kinase, notamment tout fragment constitué d'au moins environ 250 acides aminés contigus de la séquence SEQ ID NO : 2.

5                   3.   Protéine caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

– la séquence SEQ ID NO : 4,

– ou toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 4, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, possédant une activité IP3 kinase,

10                   – toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 4, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 71 % avec la région comprise entre les acides aminés en position (360) et (669) de la séquence SEQ ID NO : 4 et possédant une activité IP3 kinase,

15                   – ou tout fragment d'une des séquences définies ci-dessus, sous réserve qu'il possède une activité IP3 kinase, notamment tout fragment constitué d'au moins environ 250 acides aminés contigus de la séquence SEQ ID NO : 4, le fragment de la séquence SEQ ID NO : 4, délimité de l'acide aminé en position (289) à l'acide aminé en position (669) étant exclu.

20                   4.   Fragments de protéine selon l'une des revendications 2 ou 3 choisis parmi les séquences délimitées :

– de l'acide aminé en position (159) à l'acide aminé en position (441) de la séquence SEQ ID NO : 2,

25                   – de l'acide aminé en position (360) à l'acide aminé en position (669) de la séquence SEQ ID NO : 4,

– de l'acide aminé en position (187) à l'acide aminé en position (461) de la séquence SEQ ID NO : 5,

– de l'acide aminé en position (195) à l'acide aminé en position (472) de la séquence SEQ ID NO : 6,

30                   – de l'acide aminé en position (331) à l'acide aminé en position (604) de la séquence SEQ ID NO : 7.

5. Séquence nucléotidique codant pour une protéine telle que définie dans l'une des revendications 2 à 4.

6. Séquence d'ADN qui comprend ou est constituée par :

- 5           – la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, par dégénérescence du code génétique, de la séquence SEQ ID NO : 1 codant pour une protéine représentée par la séquence SEQ ID NO : 2,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, de la séquence SEQ ID NO : 1 codant pour une protéine dérivée de la séquence SEQ ID NO : 2 possédant une activité IP3 kinase,
- ou toute séquence nucléotidique homologue de la séquence SEQ ID NO : 1, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 50% avec 700 nucléotides contigus situés dans le domaine délimité du nucléotide en position (1425) au nucléotide en position (3969) de la séquence SEQ ID NO : 1, codant pour une protéine homologue de la séquence SEQ ID NO : 2 et possédant une activité IP3 kinase,
- ou tout fragment de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 ou des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 700 nucléotides contigus situés dans le domaine délimité au nucléotide en position (1425) au nucléotide en position (3969) de ladite séquence et codant pour une protéine qui possède une activité IP3 kinase,
- ou toute séquence nucléotidique complémentaire des séquences ou fragments susmentionnés,
- ou toute séquence nucléotidique susceptible d'hybrider dans des conditions stringentes avec la séquence complémentaire de l'une des séquences ou de l'un des fragments susmentionnés.

7. Séquence d'ADN qui comprend ou est constituée par :

- 30           – la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 3,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, par dégénérescence du code génétique, de la séquence SEQ ID NO : 3 codant pour une protéine représentée par la séquence SEQ ID NO : 4,

– ou toute séquence nucléotidique dérivée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, de la séquence SEQ ID NO : 3 codant pour une protéine dérivée de la séquence SEQ ID NO : 4 possédant une activité IP3 kinase,

5                   – ou toute séquence nucléotidique homologue de la séquence SEQ ID NO : 3, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 50% avec 700 nucléotides contigus situés dans le domaine délimité du nucléotide en position (3234) au nucléotide en position (6021) de la séquence SEQ ID NO : 3, codant pour une protéine homologue de la séquence SEQ ID NO : 4 et possédant une activité IP3 kinase,

10                   – ou tout fragment de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 3 ou des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 700 nucléotides contigus situés dans le domaine délimité au nucléotide en position (3234) au nucléotide en position (6021) de ladite séquence et codant pour une protéine qui possède une activité IP3 kinase,

15                   – ou toute séquence nucléotidique complémentaire des séquences ou fragments susmentionnés,

                    – ou toute séquence nucléotidique susceptible d'hybrider dans des conditions stringentes avec la séquence complémentaire de l'une des séquences ou de l'un des fragments susmentionnés.

20                   8. Vecteur recombinant, notamment plasmide, cosmide, phage ou ADN de virus, contenant une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 5, 6 ou 7.

25                   9. Vecteur recombinant selon la revendication 8, contenant les éléments nécessaires à l'expression dans une cellule hôte des polypeptides codés par les acides nucléiques selon l'une des revendications 5, 6 ou 7, insérés dans ledit vecteur.

30                   10. Cellule hôte, choisie notamment parmi les bactéries, les virus, les levures, les champignons, les plantes ou les cellules de mammifères, ladite cellule hôte étant transformée, notamment à l'aide d'un vecteur recombinant selon l'une des revendications 8 ou 9.

11. Oligonucléotides antisens ou ARN messenger antisens dérivés des séquences nucléotidiques selon l'une des revendications 5, 6 ou 7.

5 12. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend une protéine ou un fragment de protéine selon l'une des revendications 2 à 4, en association avec un vecteur pharmaceutique acceptable .

10 13. Utilisation de l'une des protéines selon l'une des revendications 2 à 4, pour la préparation de médicaments destinés au traitement de maladies liées au stress oxydatif.

14. Utilisation de l'une des protéines selon l'une des revendications 2 à 4, pour la préparation de médicaments destinés au traitement de maladies liées au stress du réticulum endoplasmique.

15 15. Utilisation de l'une des protéines selon l'une des revendications 2 à 4, pour la préparation de médicaments destinés au traitement de maladies neurodégénératives, notamment rétiniennes.

20 16. Cellules animales qui contiennent, dans leur génome, une séquence nucléotidique codant pour l'une des protéines selon l'une des revendications 2 à 4, et notamment une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 5 à 7.

25 17. Animal transgénique non humain contenant des cellules selon la revendication 16, et qui surexprime l'une des protéines définies dans l'une des revendications 2 à 4.

30 18. Animal transgénique non humain contenant des cellules selon la revendication 16, dans lequel l'expression du gène, codant pour l'une des protéines définies dans les revendications 2 à 4, est supprimée.

1 / 7

Viabilité des mâles  
sur milieu 1%  $H_2O_2$

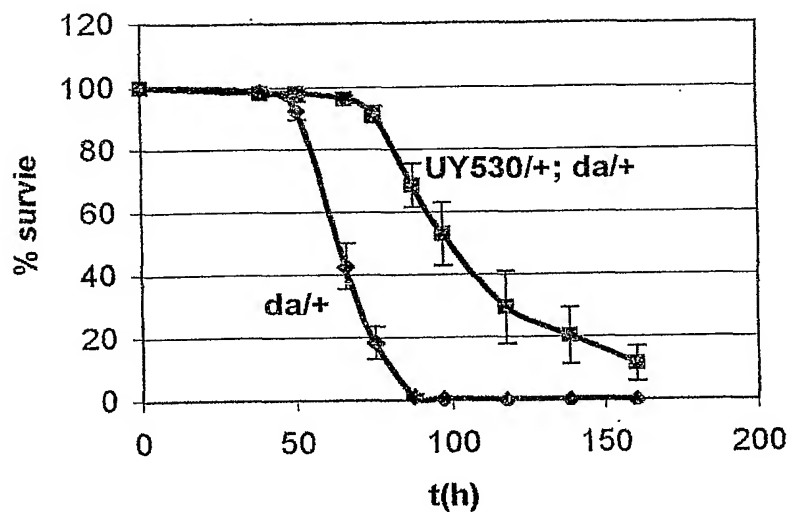


FIGURE 1A

Viabilité des femelles  
sur milieu 1%  $H_2O_2$

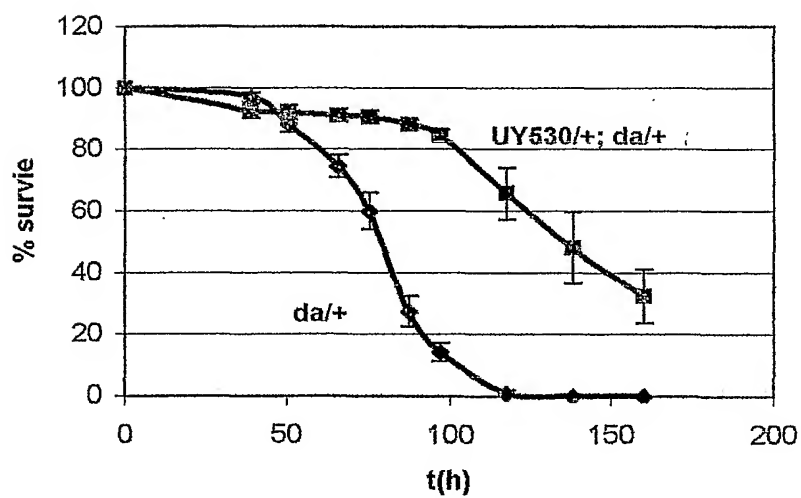


FIGURE 1B

2 / 7

Viabilité des mâles  
sur milieu 3%  $H_2O_2$

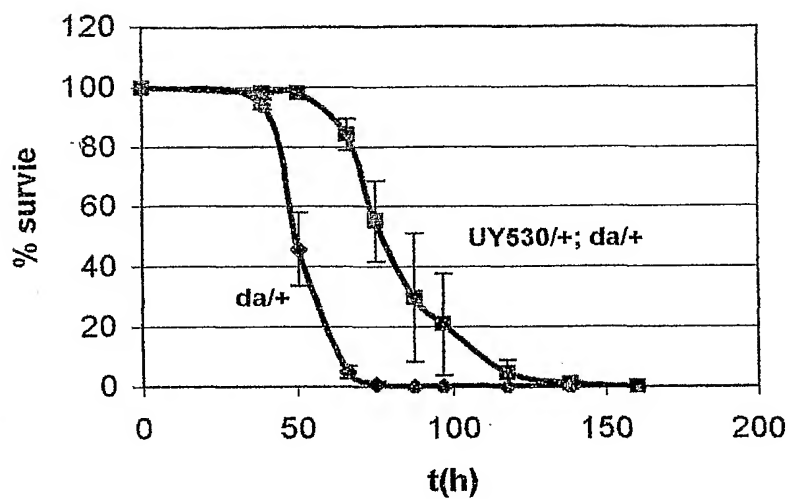


FIGURE 1C

Viabilité des femelles  
sur milieu 3%  $H_2O_2$

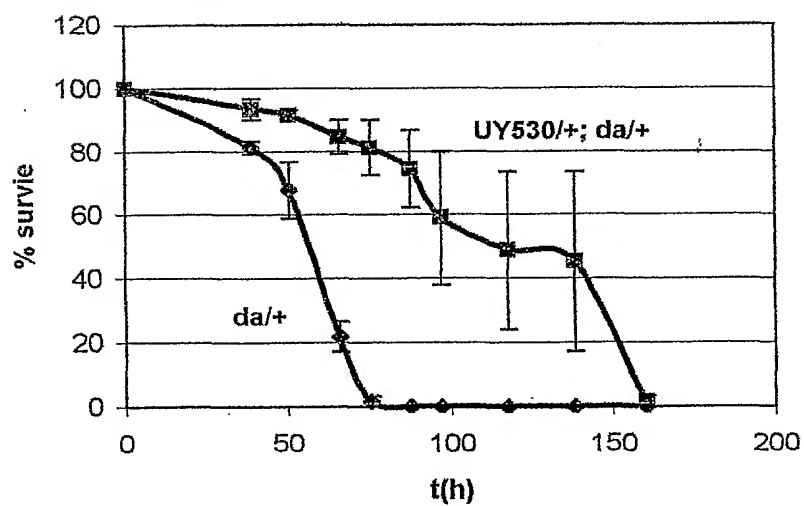


FIGURE 1D

3 / 7

Viabilité des mâles  
sur milieu 5%  $H_2O_2$

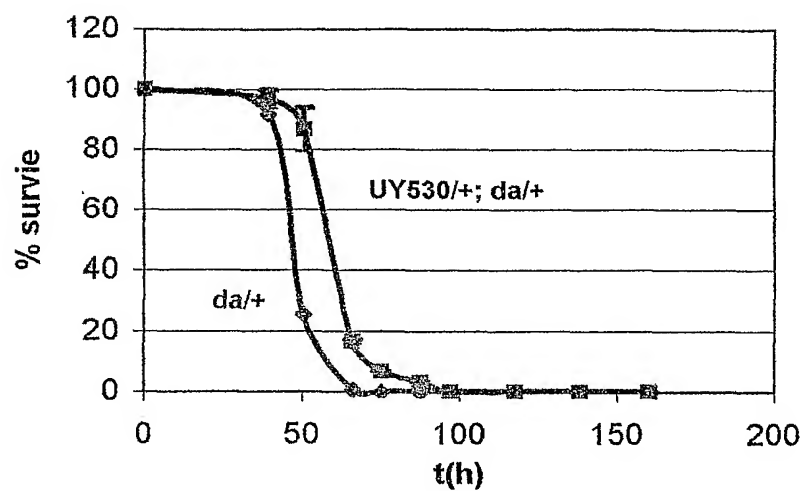


FIGURE 1E

Viabilité des femelles  
sur milieu 5%  $H_2O_2$

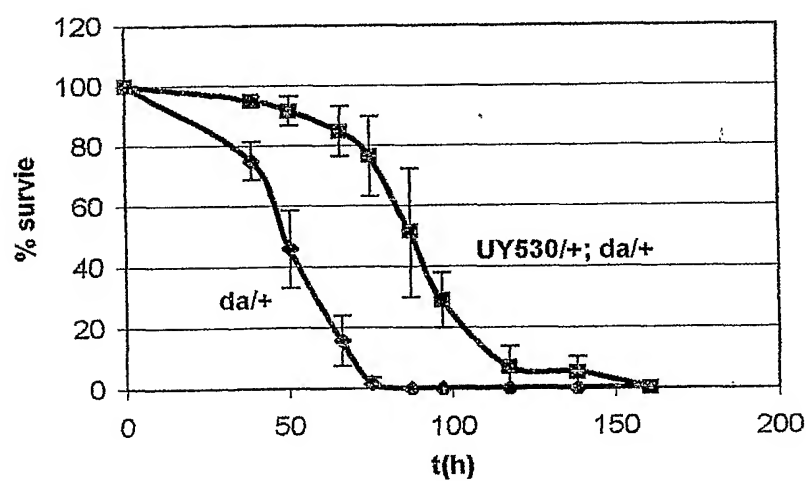


FIGURE 1F

4 / 7

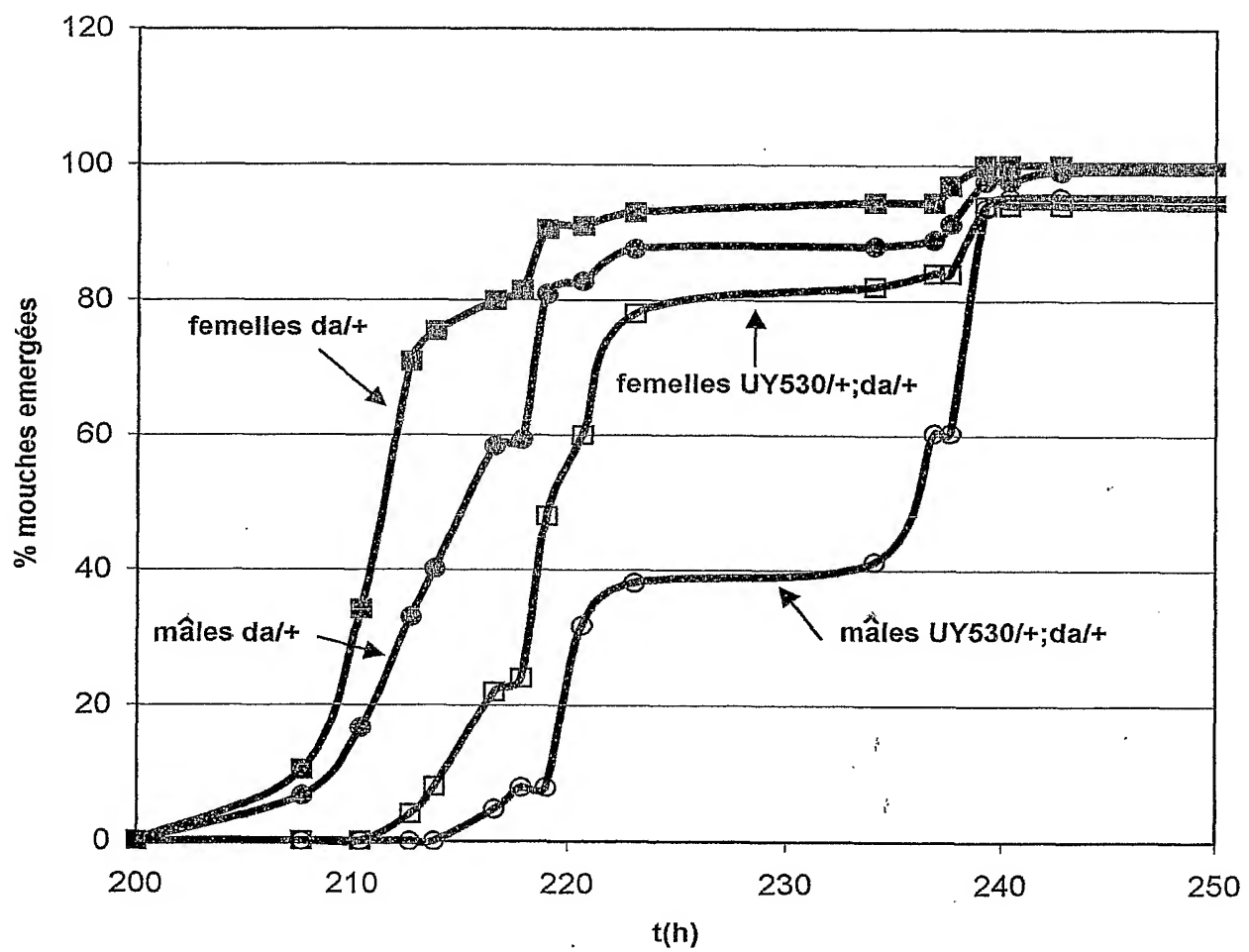


FIGURE 2



5 / 7

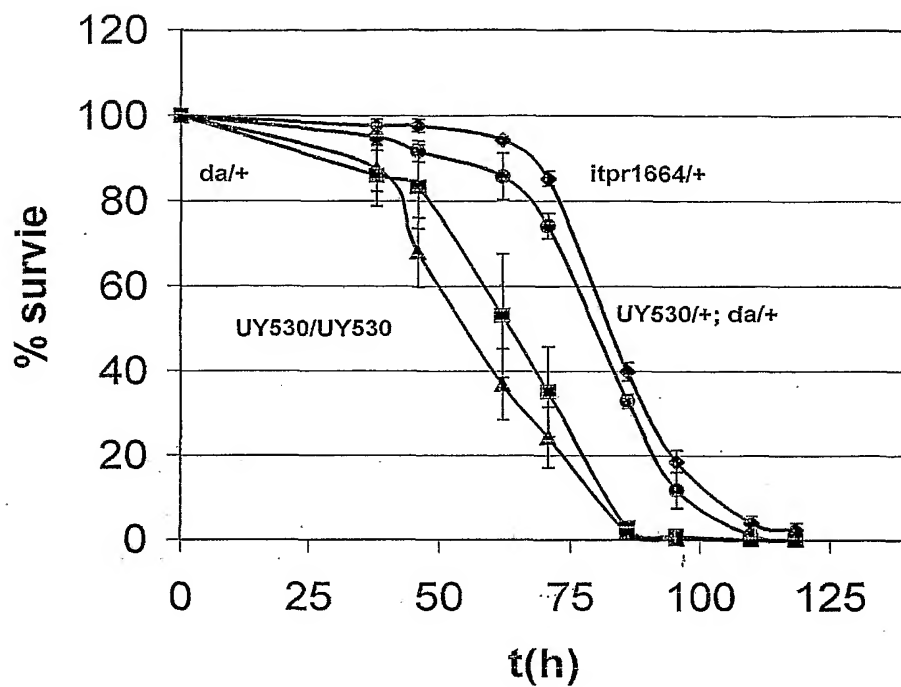


FIGURE 3A

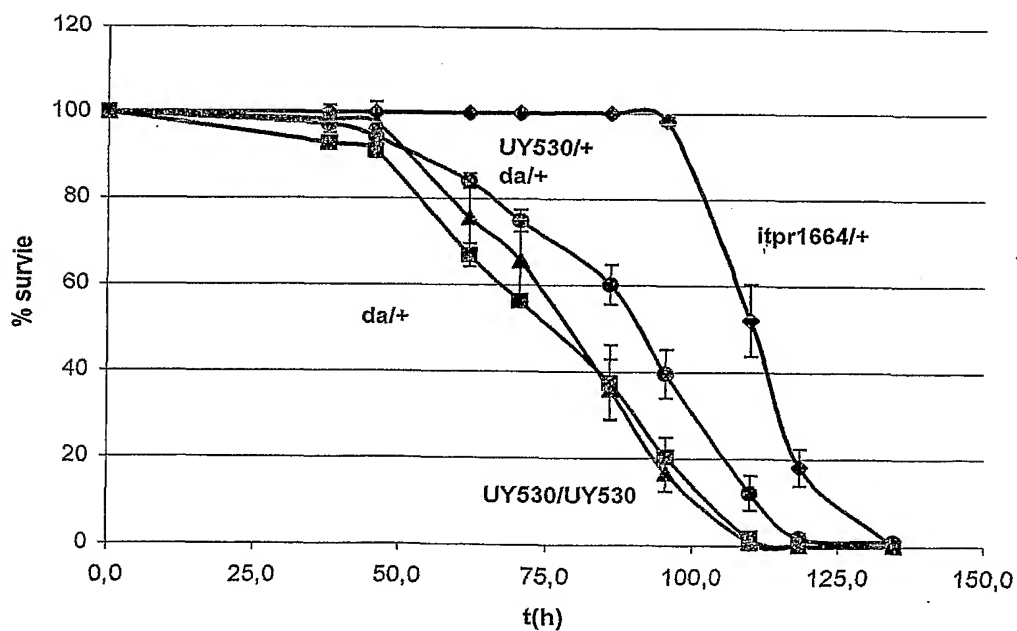


FIGURE 3B

6 / 7

## Réduction de la longévité de la souche UY 530 à 26°C

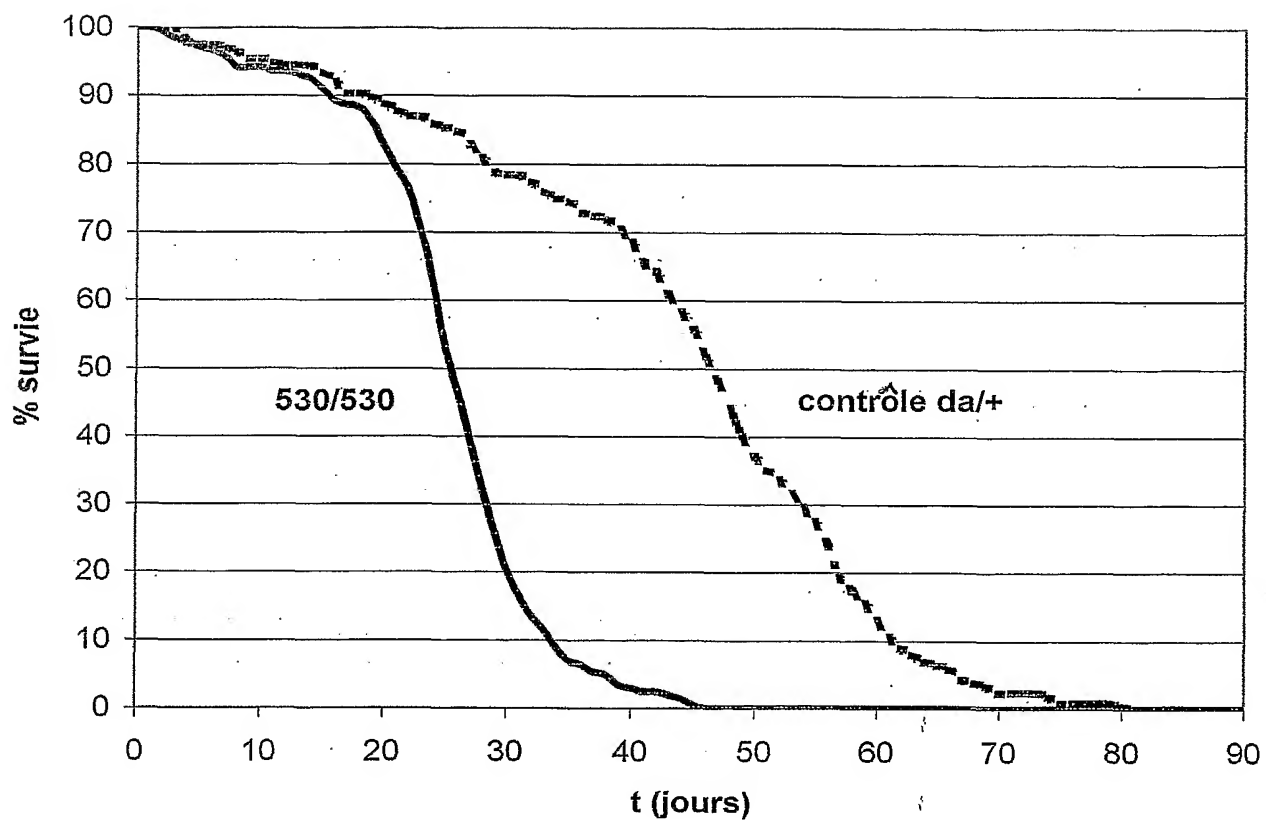


FIGURE 4

7/7

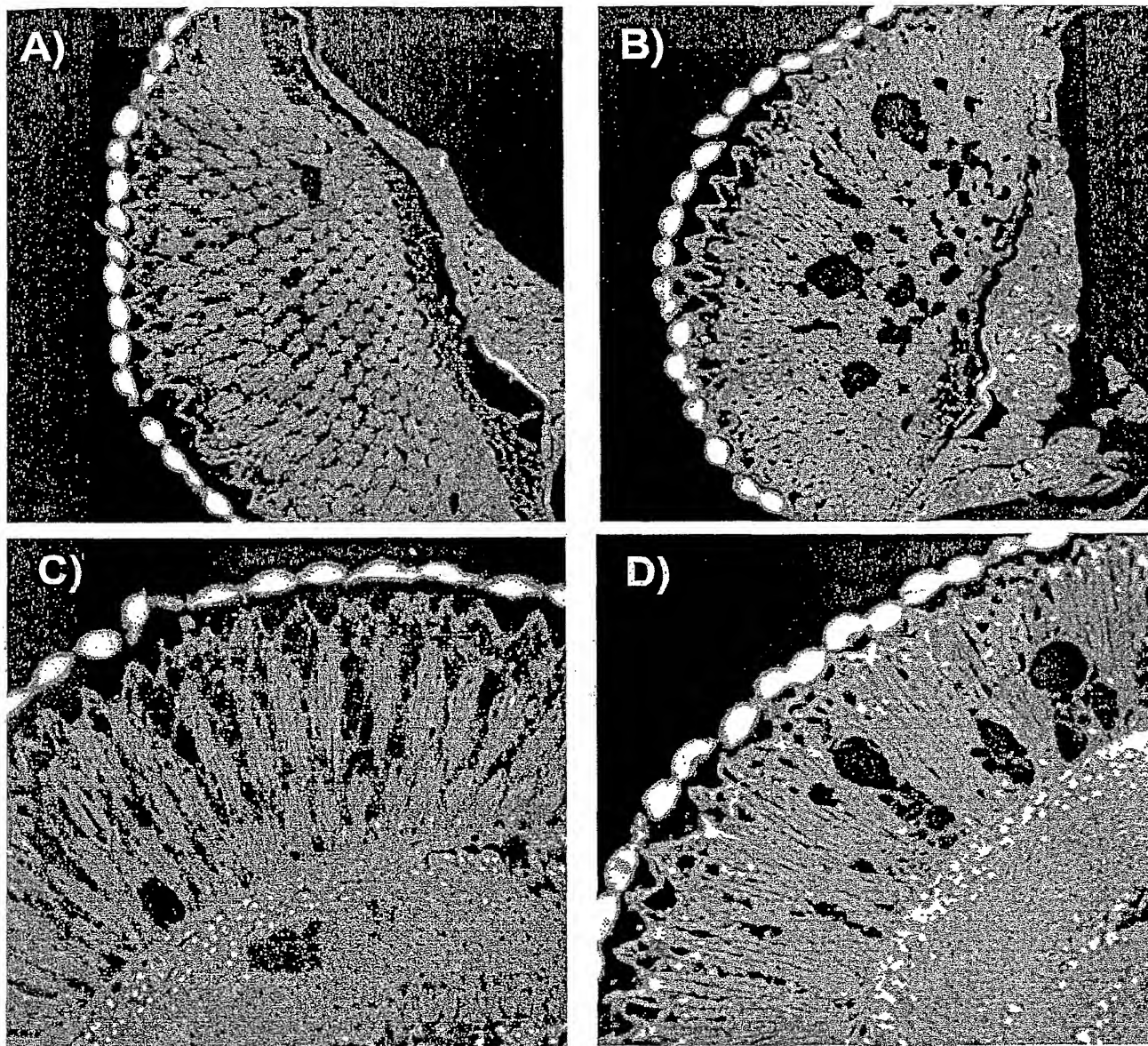


FIGURE 5

## LISTE DE SEQUENCES

&lt;110&gt; CNRS

<120> UTILISATION D'IP3 KINASES POUR LA PREPARATION DE  
MEDICAMENTS, NOUVELLES IP3 KINASES ET SEQUENCES D'ADN  
CORRESPONDANTES

&lt;130&gt; WOB 00 AT CNR IP3K

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; FR 00 11397

&lt;151&gt; 2000-09-07

&lt;160&gt; 7

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1350

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Drosophila melanogaster

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1323)

&lt;400&gt; 1

atg act atg act tct acg gtg ctc caa cgg ccc att caa gcc aag cca	48
Met Thr Met Thr Ser Thr Val Leu Gln Arg Pro Ile Gln Ala Lys Pro	
1 5 10 15	
gag aag aag gcc tcc tcc aaa tcg acc agc tcc tcg aga agc cgc tcc	96
Glu Lys Lys Ala Ser Ser Lys Ser Thr Ser Ser Ser Arg Ser Arg Ser	
20 25 30	
acg atg gcc tgg tcc aat gag aag ctg cgc ttc tcc tgc atc gac aac	144
Thr Met Ala Trp Ser Asn Glu Lys Leu Arg Phe Ser Cys Ile Asp Asn	
35 40 45	
atc gga ctc aag cag cta tgg aag ctg att gcc ctg gac acg agt gct	192
Ile Gly Leu Lys Gln Leu Trp Lys Leu Ile Ala Leu Asp Thr Ser Ala	
50 55 60	
tca tcc aag cag cgc agt gcc atg atg ttg gaa gtg gag caa cag cag	240
Ser Ser Lys Gln Arg Ser Ala Met Met Leu Glu Val Glu Gln Gln Gln	
65 70 75 80	
caa cag cag cag cag cag caa tcg aac aac aat aac gag cgg ata ccc	288
Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Ser Asn Asn Asn Asn Glu Arg Ile Pro	
85 90 95	
aac gag aac tgc gac tat ttg agt cta cag aga tcg ggc cag gcg ccg	336
Asn Glu Asn Cys Asp Tyr Leu Ser Leu Gln Arg Ser Gly Gln Ala Pro	
100 105 110	
aag aat cac atc cag gcg cag gat ccg gct cag atg tcc ctg ctc aag	384
Lys Asn His Ile Gln Ala Gln Asp Pro Ala Gln Met Ser Leu Leu Lys	
115 120 125	

ttc ttg gcc att aat gcc cta gag ctg agt gcc cca gca acg cca cat	432
Phe Leu Ala Ile Asn Ala Leu Glu Leu Ser Ala Pro Ala Thr Pro His	
130 135 140	
ctc ctc cag cat cag cag gcc cac aag cag gcg aag cca cag ggc tgg	480
Leu Leu Gln His Gln Gln Ala His Lys Gln Ala Lys Pro Gln Gly Trp	
145 150 155 160	
atg cag cta tcc ggt cac cca gag agc att gtt ccc aca tcg act gga	528
Met Gln Leu Ser Gly His Pro Glu Ser Ile Val Pro Thr Ser Thr Gly	
165 170 175	
ata gtg cgc aaa cgg atc tca gga ctg gag gat agc gaa gta cat gcc	576
Ile Val Arg Lys Arg Ile Ser Gly Leu Glu Asp Ser Glu Val His Ala	
180 185 190	
tac cga ctg atc tgc aag gaa cca cag acc gct cag ata gtg ccc gcc	624
Tyr Arg Leu Ile Cys Lys Glu Pro Gln Thr Ala Gln Ile Val Pro Ala	
195 200 205	
tac ttt gga ata cag gag atg caa tca cag cac ttt att gag ctg cag	672
Tyr Phe Gly Ile Gln Glu Met Gln Ser Gln His Phe Ile Glu Leu Gln	
210 215 220	
gat ctg ctg gct ggc ttt cgg gat ccg tgt gtg atg gac atc aag atg	720
Asp Leu Leu Ala Gly Phe Arg Asp Pro Cys Val Met Asp Ile Lys Met	
225 230 235 240	
ggc agc cgc acc ttt ctc gaa tcg gag gtc agc aat gcc acg ctc aga	768
Gly Ser Arg Thr Phe Leu Glu Ser Glu Val Ser Asn Ala Thr Leu Arg	
245 250 255	
ccg gac ctc tac cag aag atg atc gcc gtg gat gcg gga gct ccc acg	816
Pro Asp Leu Tyr Gln Lys Met Ile Ala Val Asp Ala Gly Ala Pro Thr	
260 265 270	
cct gcg gag cac gag gca cga gcg atc acc aag ctg cgg tac atg aca	864
Pro Ala Glu His Glu Ala Arg Ala Ile Thr Lys Leu Arg Tyr Met Thr	
275 280 285	
ttc cgg gag tcc ctg tcc tcc tcc cac tcc aag ggt ttc cgg atc gaa	912
Phe Arg Glu Ser Leu Ser Ser Ser His Ser Lys Gly Phe Arg Ile Glu	
290 295 300	
gca ctg cgt ctg cgc gga cga ccg cct gtc aag gat ttg aag acg tgc	960
Ala Leu Arg Leu Arg Gly Arg Pro Pro Val Lys Asp Leu Lys Thr Cys	
305 310 315 320	
cga agc agc gag cag att gcc cag acg atc gaa cag ttt ctg gct gct	1008
Arg Ser Ser Glu Gln Ile Ala Gln Thr Ile Glu Gln Phe Leu Ala Ala	
325 330 335	
cgg cga tcc gtg caa aag gag ctg ctg aag cga cta aag cac atg cgc	1056
Arg Arg Ser Val Gln Lys Glu Leu Leu Lys Arg Leu Lys His Met Arg	
340 345 350	
ctg gtc atc gaa cag tcg acc ttc ttc gcc agc cac gag atc att ggc	1104
Leu Val Ile Glu Gln Ser Thr Phe Phe Ala Ser His Glu Ile Ile Gly	
355 360 365	

```

tcc agc atc ttt atc gtc tac gat gac gat cgc gtt ggc gtt tgg cta 1152
Ser Ser Ile Phe Ile Val Tyr Asp Asp Asp Arg Val Gly Val Trp Leu
370 - 375 380

att gac ttc gcc aag tgc cgg gag ctg cca ccc cat gtg agg gtg gac 1200
Ile Asp Phe Ala Lys Cys Arg Glu Leu Pro Pro His Val Arg Val Asp
385 390 395 400

cat cga agt gct tgg gcg cct gga aac cga gag gag ggt ctg cta cgc 1248
His Arg Ser Ala Trp Ala Pro Gly Asn Arg Glu Glu Gly Leu Leu Arg
405 410 415

gga atg gac gag ctg atc cgc tcc ttc gag gag gtc tac gcc cgc tgt 1296
Gly Met Asp Glu Leu Ile Arg Ser Phe Glu Glu Val Tyr Ala Arg Cys
420 425 430

ggc tcc cat cgc agc tgc ctt aaa atc taatggatag acacggatcg attgcac 1350
Gly Ser His Arg Ser Cys Leu Lys Ile
435 440

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 441

&lt;212&gt; PRT

<213> *Drosophila melanogaster*

&lt;400&gt; 2

```

Met Thr Met Thr Ser Thr Val Leu Gln Arg Pro Ile Gln Ala Lys Pro
1 5 10 15

Glu Lys Lys Ala Ser Ser Lys Ser Thr Ser Ser Ser Arg Ser Arg Ser
20 25 30

Thr Met Ala Trp Ser Asn Glu Lys Leu Arg Phe Ser Cys Ile Asp Asn
35 40 45

Ile Gly Leu Lys Gln Leu Trp Lys Leu Ile Ala Leu Asp Thr Ser Ala
50 55 60

Ser Ser Lys Gln Arg Ser Ala Met Met Leu Glu Val Glu Gln Gln Gln
65 70 75 80

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Ser Asn Asn Asn Asn Glu Arg Ile Pro
85 90 95

Asn Glu Asn Cys Asp Tyr Leu Ser Leu Gln Arg Ser Gly Gln Ala Pro
100 105 110

Lys Asn His Ile Gln Ala Gln Asp Pro Ala Gln Met Ser Leu Leu Lys
115 120 125

Phe Leu Ala Ile Asn Ala Leu Glu Leu Ser Ala Pro Ala Thr Pro His
130 135 140

Leu Leu Gln His Gln Gln Ala His Lys Gln Ala Lys Pro Gln Gly Trp
145 150 155 160

Met Gln Leu Ser Gly His Pro Glu Ser Ile Val Pro Thr Ser Thr Gly
165 170 175

```

Ile Val Arg Lys Arg Ile Ser Gly Leu Glu Asp Ser Glu Val His Ala  
 180 185 190  
 Tyr Arg Leu Ile Cys Lys Glu Pro Gln Thr Ala Gln Ile Val Pro Ala  
 195 200 205  
 Tyr Phe Gly Ile Gln Glu Met Gln Ser Gln His Phe Ile Glu Leu Gln  
 210 215 220  
 Asp Leu Leu Ala Gly Phe Arg Asp Pro Cys Val Met Asp Ile Lys Met  
 225 230 235 240  
 Gly Ser Arg Thr Phe Leu Glu Ser Glu Val Ser Asn Ala Thr Leu Arg  
 245 250 255  
 Pro Asp Leu Tyr Gln Lys Met Ile Ala Val Asp Ala Gly Ala Pro Thr  
 260 265 270  
 Pro Ala Glu His Glu Ala Arg Ala Ile Thr Lys Leu Arg Tyr Met Thr  
 275 280 285  
 Phe Arg Glu Ser Leu Ser Ser Ser His Ser Lys Gly Phe Arg Ile Glu  
 290 295 300  
 Ala Leu Arg Leu Arg Gly Arg Pro Pro Val Lys Asp Leu Lys Thr Cys  
 305 310 315 320  
 Arg Ser Ser Glu Gln Ile Ala Gln Thr Ile Glu Gln Phe Leu Ala Ala  
 325 330 335  
 Arg Arg Ser Val Gln Lys Glu Leu Leu Lys Arg Leu Lys His Met Arg  
 340 345 350  
 Leu Val Ile Glu Gln Ser Thr Phe Phe Ala Ser His Glu Ile Ile Gly  
 355 360 365  
 Ser Ser Ile Phe Ile Val Tyr Asp Asp Asp Arg Val Gly Val Trp Leu  
 370 375 380  
 Ile Asp Phe Ala Lys Cys Arg Glu Leu Pro Pro His Val Arg Val Asp  
 385 390 395 400  
 His Arg Ser Ala Trp Ala Pro Gly Asn Arg Glu Glu Gly Leu Leu Arg  
 405 410 415  
 Gly Met Asp Glu Leu Ile Arg Ser Phe Glu Glu Val Tyr Ala Arg Cys  
 420 425 430  
 Gly Ser His Arg Ser Cys Leu Lys Ile  
 435 440

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 2010

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Drosophila melanogaster

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (2007)

```

<400> 3
atg tcc gtg tgc gcc ctc agc cag cca cag cag ccg aat aaa tcc aat 48
Met Ser Val Cys Ala Leu Ser Gln Pro Gln Gln Pro Asn Lys Ser Asn
1 5 10 15

cag aat cag aag cag aag aac ggg cca gct aga tta ccg gcc ttg gca 96
Gln Asn Gln Lys Gln Lys Asn Gly Pro Ala Arg Leu Pro Ala Leu Ala
20 25 30

acc gga aac gga agt gca agt gca agt gca agt ggc ata aac cta aac 144
Thr Gly Asn Gly Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Gly Ile Asn Leu Asn
35 40 45

ggc aaa gcc aag ggc tcc gta acg cca ccg aca ccg ccg ccc tcg ccg 192
Gly Lys Ala Lys Gly Ser Val Thr Pro Pro Thr Pro Pro Pro Ser Pro
50 55 60

cag gta cga atc tac gag gat ttc gac aga atg agc gcc aag gag gtg 240
Gln Val Arg Ile Tyr Glu Asp Phe Asp Arg Met Ser Ala Lys Glu Val
65 70 75 80

tac tac aat gag gcg ggc aag aag gtg acc gtg aag ctg ctg cac ttc 288
Tyr Tyr Asn Glu Ala Gly Lys Lys Val Thr Val Lys Leu Leu His Phe
85 90 95

ccc gac gtt ccg ccc gag gag ata tcc aaa ttg aaa ttc gac gat gac 336
Pro Asp Val Pro Pro Glu Glu Ile Ser Lys Leu Lys Phe Asp Asp Asp
100 105 110

gac gat gac gag gaa gag gat gga aat gga ggc gaa aac gaa aat ggt 384
Asp Asp Asp Glu Glu Glu Asp Gly Asn Gly Gly Glu Asn Glu Asn Gly
115 120 125

gac gat gac aat ggc gag gag gcc gat gag gat agc gat tcc gga cgc 432
Asp Asp Asp Asn Gly Glu Glu Ala Asp Glu Asp Ser Asp Ser Gly Arg
130 135 140

aga ccg aca tcg gcg gac agc gag gat gcg ggc cac aag tcg gag tca 480
Arg Pro Thr Ser Ala Asp Ser Glu Asp Ala Gly His Lys Ser Glu Ser
145 150 155 160

agt ggc ggc gcc agc aat gcc aac gct ttg ccc agt tcc tcc tcc aag 528
Ser Gly Gly Ala Ser Asn Ala Asn Ala Leu Pro Ser Ser Ser Ser Lys
165 170 175

aag atc ttt cgc cgc aaa ctc tcc ggc aac aat atg cag ccg cgt aaa 576
Lys Ile Phe Arg Arg Lys Leu Ser Gly Asn Asn Met Gln Pro Arg Lys
180 185 190

tgc agt ttg gcc ttc gcc cag gcc cat ggg att cgc cag cga gcg gag 624
Cys Ser Leu Ala Phe Ala Gln Ala His Gly Ile Arg Gln Arg Ala Glu
195 200 205

aag aag cta tcg atg ccg acc att agc att acg gcc aat tcg ggt gag 672
Lys Lys Leu Ser Met Pro Thr Ile Ser Ile Thr Ala Asn Ser Gly Glu
210 215 220

cat gtg gcc cac aat tgt ggc ctg cgc ttg aat ttg ggc cgc aag ctg 720
His Val Ala His Asn Cys Gly Leu Arg Leu Asn Leu Gly Arg Lys Leu
225 230 235 240

```



tcg caa cag cat	tcg ctg ccc ctg ggc tca ccc acc tcg cca gca tcg	768
Ser Gln Gln His	Ser Leu Pro Leu Gly Ser Pro Thr Ser Pro Ala Ser	
245	250 255	
cca acg agc ccg gga cca cga cga tcg cat tcg cca ttg ggc caa agt	816	
Pro Thr Ser Pro Gly Pro Arg Arg Ser His Ser Pro Leu Gly Gln Ser		
260 265 270		
ctg tgt ccc ggc tac att cag tac tcc aag tcg ctg ctg gag gtg ccc	864	
Leu Cys Pro Gly Tyr Ile Gln Tyr Ser Lys Ser Leu Leu Glu Val Pro		
275 280 285		
atg ccg cgg gac tat ggc tac gcc agc agc gat gat ctc agc tcc gaa	912	
Met Pro Arg Asp Tyr Gly Tyr Ala Ser Ser Asp Asp Leu Ser Ser Glu		
290 295 300		
tgg gac tcg gat gtg tcg acc tcg gcg gct ggc tcg gca acg gga tcg	960	
Trp Asp Ser Asp Val Ser Thr Ser Ala Ala Gly Ser Ala Thr Gly Ser		
305 310 315 320		
gga tcg ggt gcc gca tcc caa gcc agc acc acc ggc aag aag agc tcc	1008	
Gly Ser Gly Ala Ser Gln Ala Ser Thr Gly Lys Lys Ser Ser		
325 330 335		
ggc tgg cga aag att cgc aac atc gtt cag tgg acg ccc ttc ttt cag	1056	
Gly Trp Arg Lys Ile Arg Asn Ile Val Gln Trp Thr Pro Phe Phe Gln		
340 345 350		
acg tac aag aag cag cgc tat cca tgg gtt caa ctg gcc gga cac cag	1104	
Thr Tyr Lys Lys Gln Arg Tyr Pro Trp Val Gln Leu Ala Gly His Gln		
355 360 365		
ggc aac ttc aag gca ggt ccc gaa ccg ggc acc gtg ctc aag aag ctc	1152	
Gly Asn Phe Lys Ala Gly Pro Glu Pro Gly Thr Val Leu Lys Lys Leu		
370 375 380		
tgt ccc aag gag gag gag tgc ttc cag att ctc atg cac gat ctg ctt	1200	
Cys Pro Lys Glu Glu Glu Cys Phe Gln Ile Leu Met His Asp Leu Leu		
385 390 395 400		
agg ccc tat gtg ccc gtt tac aag ggt cag gtg acc agc gag gat ggc	1248	
Arg Pro Tyr Val Pro Val Tyr Lys Gly Gln Val Thr Ser Glu Asp Gly		
405 410 415		
gaa ctt tac ctg cag ctg cag gat ctg ctc agt gac tat gtg cag cca	1296	
Glu Leu Tyr Leu Gln Leu Gln Asp Leu Leu Ser Asp Tyr Val Gln Pro		
420 425 430		
tgc gtc atg gac tgc aag gtg ggt gtg cgc acc tat ctg gag gag gag	1344	
Cys Val Met Asp Cys Lys Val Gly Val Arg Thr Tyr Leu Glu Glu Glu		
435 440 445		
ctg tcc aag gcc aag gag aag ccc aag ctg cgc aag gat atg tac gac	1392	
Leu Ser Lys Ala Lys Glu Lys Pro Lys Leu Arg Lys Asp Met Tyr Asp		
450 455 460		
aag atg atc caa atc gac agc cac gct ccc acc gcc gag gag cac gca	1440	
Lys Met Ile Gln Ile Asp Ser His Ala Pro Thr Ala Glu Glu His Ala		
465 470 475 480		

```

gcc aag gcg gtg acc aag cca cgt tac atg gtc tgg cgt gag acc atc 1488
Ala Lys Ala Val Thr Lys Pro Arg Tyr Met Val Trp Arg Glu Thr Ile
                        485                        490                        495

tcc agc acg gcc acg ctg gga ttc cgc atc gag ggc atc aag aag agc 1536
Ser Ser Thr Ala Thr Leu Gly Phe Arg Ile Glu Gly Ile Lys Lys Ser
                        500                        505                        510

gat ggc acc agt tcc aaa gat ttc aaa acg acg aag tca cgc gaa caa 1584
Asp Gly Thr Ser Ser Lys Asp Phe Lys Thr Thr Lys Ser Arg Glu Gln
                        515                        520                        525

atc aag ttg gcc ttt ctc gag ttc ctc agc ggt cac cca cat att ttg 1632
Ile Lys Leu Ala Phe Leu Glu Phe Leu Ser Gly His Pro His Ile Leu
                        530                        535                        540

ccc cgc tac ata cag cgt ttg cga gcc ata agg gcc acc ctt gcg gtc 1680
Pro Arg Tyr Ile Gln Arg Leu Arg Ala Ile Arg Ala Thr Leu Ala Val
545                        550                        555                        560

tcg gaa ttc ttc cag acc cac gag gtt atc ggc agc tcc ctg ctc ttc 1728
Ser Glu Phe Phe Gln Thr His Glu Val Ile Gly Ser Ser Leu Leu Phe
                        565                        570                        575

gtc cac gat cag acc cac gcc agc ata tgg cta att gat ttc gcc aag 1776
Val His Asp Gln Thr His Ala Ser Ile Trp Leu Ile Asp Phe Ala Lys
                        580                        585                        590

acg gtg gag ctg ccg ccg cag ctg cgg atc gat cac tac tcc gcc tgg 1824
Thr Val Glu Leu Pro Pro Gln Leu Arg Ile Asp His Tyr Ser Ala Trp
                        595                        600                        605

aag gtg ggc aac cac gaa gat ggc tat ctc atc ggt atc aac aat ctc 1872
Lys Val Gly Asn His Glu Asp Gly Tyr Leu Ile Gly Ile Asn Asn Leu
610                        615                        620

att gat atc ttt gtg gag ctg cag gca tcc atg gag gcg gag gcg cat 1920
Ile Asp Ile Phe Val Glu Leu Gln Ala Ser Met Glu Ala Glu Ala His
625                        630                        635                        640

gcg caa gcg cag gcg gag gcc att cag tca ccc gtt tct ggt tct gga 1968
Ala Gln Ala Gln Ala Glu Ala Ile Gln Ser Pro Val Ser Gly Ser Gly
                        645                        650                        655

gga gat caa gcg gag cag acg ggt gaa gag agc aaa ccc taa 2010
Gly Asp Gln Ala Glu Gln Thr Gly Glu Glu Ser Lys Pro
                        660                        665

```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 669

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Drosophila melanogaster

&lt;400&gt; 4

```

Met Ser Val Cys Ala Leu Ser Gln Pro Gln Gln Pro Asn Lys Ser Asn
  1                        5                        10                        15

```

```

Gln Asn Gln Lys Gln Lys Asn Gly Pro Ala Arg Leu Pro Ala Leu Ala
      20                        25                        30

```

Thr Gly Asn Gly Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Gly Ile Asn Leu Asn  
 - 35 40 45  
 Gly Lys Ala Lys Gly Ser Val Thr Pro Pro Thr Pro Pro Pro Ser Pro  
 50 55 60  
 Gln Val Arg Ile Tyr Glu Asp Phe Asp Arg Met Ser Ala Lys Glu Val  
 65 70 75 80  
 Tyr Tyr Asn Glu Ala Gly Lys Lys Val Thr Val Lys Leu Leu His Phe  
 85 90 95  
 Pro Asp Val Pro Pro Glu Glu Ile Ser Lys Leu Lys Phe Asp Asp Asp  
 100 105 110  
 Asp Asp Asp Glu Glu Glu Asp Gly Asn Gly Gly Glu Asn Glu Asn Gly  
 115 120 125  
 Asp Asp Asp Asn Gly Glu Glu Ala Asp Glu Asp Ser Asp Ser Gly Arg  
 130 135 140  
 Arg Pro Thr Ser Ala Asp Ser Glu Asp Ala Gly His Lys Ser Glu Ser  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Gly Ala Ser Asn Ala Asn Ala Leu Pro Ser Ser Ser Ser Lys  
 165 170 175  
 Lys Ile Phe Arg Arg Lys Leu Ser Gly Asn Asn Met Gln Pro Arg Lys  
 180 185 190  
 Cys Ser Leu Ala Phe Ala Gln Ala His Gly Ile Arg Gln Arg Ala Glu  
 195 200 205  
 Lys Lys Leu Ser Met Pro Thr Ile Ser Ile Thr Ala Asn Ser Gly Glu  
 210 215 220  
 His Val Ala His Asn Cys Gly Leu Arg Leu Asn Leu Gly Arg Lys Leu  
 225 230 235 240  
 Ser Gln Gln His Ser Leu Pro Leu Gly Ser Pro Thr Ser Pro Ala Ser  
 245 250 255  
 Pro Thr Ser Pro Gly Pro Arg Arg Ser His Ser Pro Leu Gly Gln Ser  
 260 265 270  
 Leu Cys Pro Gly Tyr Ile Gln Tyr Ser Lys Ser Leu Leu Glu Val Pro  
 275 280 285  
 Met Pro Arg Asp Tyr Gly Tyr Ala Ser Ser Asp Asp Leu Ser Ser Glu  
 290 295 300  
 Trp Asp Ser Asp Val Ser Thr Ser Ala Ala Gly Ser Ala Thr Gly Ser  
 305 310 315 320  
 Gly Ser Gly Ala Ala Ser Gln Ala Ser Thr Thr Gly Lys Lys Ser Ser  
 325 330 335  
 Gly Trp Arg Lys Ile Arg Asn Ile Val Gln Trp Thr Pro Phe Phe Gln  
 340 345 350

Thr Tyr Lys Lys Gln Arg Tyr Pro Trp Val Gln Leu Ala Gly His Gln  
 355 360 365  
 Gly Asn Phe Lys Ala Gly Pro Glu Pro Gly Thr Val Leu Lys Lys Leu  
 370 375 380  
 Cys Pro Lys Glu Glu Glu Cys Phe Gln Ile Leu Met His Asp Leu Leu  
 385 390 395 400  
 Arg Pro Tyr Val Pro Val Tyr Lys Gly Gln Val Thr Ser Glu Asp Gly  
 405 410 415  
 Glu Leu Tyr Leu Gln Leu Gln Asp Leu Leu Ser Asp Tyr Val Gln Pro  
 420 425 430  
 Cys Val Met Asp Cys Lys Val Gly Val Arg Thr Tyr Leu Glu Glu Glu  
 435 440 445  
 Leu Ser Lys Ala Lys Glu Lys Pro Lys Leu Arg Lys Asp Met Tyr Asp  
 450 455 460  
 Lys Met Ile Gln Ile Asp Ser His Ala Pro Thr Ala Glu Glu His Ala  
 465 470 475 480  
 Ala Lys Ala Val Thr Lys Pro Arg Tyr Met Val Trp Arg Glu Thr Ile  
 485 490 495  
 Ser Ser Thr Ala Thr Leu Gly Phe Arg Ile Glu Gly Ile Lys Lys Ser  
 500 505 510  
 Asp Gly Thr Ser Ser Lys Asp Phe Lys Thr Thr Lys Ser Arg Glu Gln  
 515 520 525  
 Ile Lys Leu Ala Phe Leu Glu Phe Leu Ser Gly His Pro His Ile Leu  
 530 535 540  
 Pro Arg Tyr Ile Gln Arg Leu Arg Ala Ile Arg Ala Thr Leu Ala Val  
 545 550 555 560  
 Ser Glu Phe Phe Gln Thr His Glu Val Ile Gly Ser Ser Leu Leu Phe  
 565 570 575  
 Val His Asp Gln Thr His Ala Ser Ile Trp Leu Ile Asp Phe Ala Lys  
 580 585 590  
 Thr Val Glu Leu Pro Pro Gln Leu Arg Ile Asp His Tyr Ser Ala Trp  
 595 600 605  
 Lys Val Gly Asn His Glu Asp Gly Tyr Leu Ile Gly Ile Asn Asn Leu  
 610 615 620  
 Ile Asp Ile Phe Val Glu Leu Gln Ala Ser Met Glu Ala Glu Ala His  
 625 630 635 640  
 Ala Gln Ala Gln Ala Glu Ala Ile Gln Ser Pro Val Ser Gly Ser Gly  
 645 650 655  
 Gly Asp Gln Ala Glu Gln Thr Gly Glu Glu Ser Lys Pro  
 660 665

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 461

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 5

```

Met Thr Leu Pro Gly Gly Pro Thr Gly Met Ala Arg Pro Gly Gly Ala
  1              5              10              15

Arg Pro Cys Ser Pro Gly Leu Glu Arg Ala Pro Arg Arg Ser Val Gly
          20              25              30

Glu Leu Arg Leu Leu Phe Glu Ala Arg Cys Ala Ala Val Ala Ala Ala
      35              40              45

Ala Ala Ala Gly Glu Pro Arg Ala Arg Gly Ala Lys Arg Arg Gly Gly
      50              55              60

Gln Val Pro Asn Gly Leu Pro Arg Ala Pro Pro Ala Pro Val Ile Pro
  65              70              75              80

Gln Leu Thr Val Thr Ala Glu Glu Pro Asp Val Pro Pro Thr Ser Pro
          85              90              95

Gly Pro Pro Glu Arg Glu Arg Asp Cys Leu Pro Ala Ala Gly Ser Ser
      100              105              110

His Leu Gln Gln Pro Arg Arg Leu Ser Thr Ser Ser Val Ser Ser Thr
      115              120              125

Gly Ser Ser Ser Leu Leu Glu Asp Ser Glu Asp Asp Leu Leu Ser Asp
      130              135              140

Ser Glu Ser Arg Ser Arg Gly Asn Val Gln Leu Glu Ala Gly Glu Asp
  145              150              155              160

Val Gly Gln Lys Asn His Trp Gln Lys Ile Arg Thr Met Val Asn Leu
          165              170              175

Pro Val Ile Ser Pro Phe Lys Lys Arg Tyr Ala Trp Val Gln Leu Ala
      180              185              190

Gly His Thr Gly Ser Phe Lys Ala Ala Gly Thr Ser Gly Leu Ile Leu
      195              200              205

Lys Arg Cys Ser Glu Pro Glu Arg Tyr Cys Leu Ala Arg Leu Met Ala
      210              215              220

Asp Ala Leu Arg Gly Cys Val Pro Ala Phe His Gly Val Val Glu Arg
  225              230              235              240

Asp Gly Glu Ser Tyr Leu Gln Leu Gln Asp Leu Leu Asp Gly Phe Asp
      245              250              255

Gly Pro Cys Val Leu Asp Cys Lys Met Gly Val Arg Thr Tyr Leu Glu
      260              265              270

Glu Glu Leu Thr Lys Ala Arg Glu Arg Pro Lys Leu Arg Lys Asp Met
      275              280              285

```

Tyr Lys Lys Met Leu Ala Val Asp Pro Glu Ala Pro Thr Glu Glu Glu  
 290 295 300  
 His Ala Gln Arg Ala Val Thr Lys Pro Arg Tyr Met Gln Trp Arg Glu  
 305 310 315 320  
 Gly Ile Ser Ser Ser Thr Thr Leu Gly Phe Arg Ile Glu Gly Ile Lys  
 325 330 335  
 Lys Ala Asp Gly Ser Cys Ser Thr Asp Phe Lys Thr Thr Arg Ser Arg  
 340 345 350  
 Glu Gln Val Leu Arg Val Phe Glu Glu Phe Val Gln Gly Asp Glu Glu  
 355 360 365  
 Val Leu Arg Arg Tyr Leu Asn Arg Leu Gln Gln Ile Arg Asp Thr Leu  
 370 375 380  
 Glu Val Ser Glu Phe Phe Arg Arg His Glu Val Ile Gly Ser Ser Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Phe Val His Asp His Cys His Arg Ala Gly Val Trp Leu Ile Asp  
 405 410 415  
 Phe Gly Lys Thr Thr Pro Leu Pro Asp Gly Gln Ile Leu Asp His Arg  
 420 425 430  
 Arg Pro Trp Glu Glu Gly Asn Arg Glu Asp Gly Tyr Leu Leu Gly Leu  
 435 440 445  
 Asp Asn Leu Ile Gly Ile Leu Ala Ser Leu Ala Glu Arg  
 450 455 460  
 Glu Ala Pro Thr Glu Glu Glu Lys Ala Gln Arg Ala Val Thr Lys Pro  
 305 310 315 320

<210> 6  
 <211> 472  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 6  
 Met Leu Glu Pro Leu Pro Cys Trp Asp Ala Ala Lys Asp Leu Lys Glu  
 1 5 10 15  
 Pro Gln Cys Pro Pro Gly Asp Arg Val Gly Val Gln Pro Gly Asn Ser  
 20 25 30  
 Arg Val Trp Gln Gly Thr Met Glu Lys Ala Gly Leu Ala Trp Thr Arg  
 35 40 45  
 Gly Thr Gly Val Gln Ser Glu Gly Thr Trp Glu Ser Gln Arg Gln Asp  
 50 55 60  
 Ser Asp Ala Leu Pro Ser Pro Glu Leu Leu Pro Gln Asp Gln Asp Lys  
 65 70 75 80

Pro Phe Leu Arg Lys Ala Cys Ser Pro Ser Asn Ile Pro Ala Val Ile  
                             85                            90                            95  
 Ile Thr Asp Met Gly Thr Gln Glu Asp Gly Ala Leu Glu Glu Thr Gln  
                             100                            105                            110  
 Gly Ser Pro Arg Gly Asn Leu Pro Leu Arg Lys Leu Ser Ser Ser Ser  
                             115                            120                            125  
 Ala Ser Ser Thr Gly Phe Ser Ser Ser Tyr Glu Asp Ser Glu Glu Asp  
                             130                            135                            140  
 Ile Ser Ser Asp Pro Glu Arg Thr Leu Asp Pro Asn Ser Ala Phe Leu  
 145                            150                            155                            160  
 His Thr Leu Asp Gln Gln Lys Pro Arg Val Ser Lys Ser Trp Arg Lys  
                             165                            170                            175  
 Ile Lys Asn Met Val His Trp Ser Pro Phe Val Met Ser Phe Lys Lys  
                             180                            185                            190  
 Lys Tyr Pro Trp Ile Gln Leu Ala Gly His Ala Gly Ser Phe Lys Ala  
                             195                            200                            205  
 Ala Ala Asn Gly Arg Ile Leu Lys Lys His Cys Glu Ser Glu Gln Arg  
                             210                            215                            220  
 Cys Leu Asp Arg Leu Met Val Asp Val Leu Arg Pro Phe Val Pro Ala  
 225                            230                            235                            240  
 Tyr His Gly Asp Val Val Lys Asp Gly Glu Arg Tyr Asn Gln Met Asp  
                             245                            250                            255  
 Asp Leu Leu Ala Asp Phe Asp Ser Pro Cys Val Met Asp Cys Lys Met  
                             260                            265                            270  
 Gly Ile Arg Thr Tyr Leu Glu Glu Glu Leu Thr Lys Ala Arg Lys Lys  
                             275                            280                            285  
 Pro Ser Leu Arg Lys Asp Met Tyr Gln Lys Met Ile Glu Val Asp Pro  
                             290                            295                            300  
 Glu Ala Pro Thr Glu Glu Glu Lys Ala Gln Arg Ala Val Thr Lys Pro  
 305                            310                            315                            320  
 Arg Tyr Met Gln Trp Arg Glu Thr Ile Ser Ser Thr Ala Thr Leu Gly  
                             325                            330                            335  
 Phe Arg Ile Glu Gly Ile Lys Lys Glu Asp Gly Thr Val Asn Arg Asp  
                             340                            345                            350  
 Phe Lys Lys Thr Lys Thr Arg Glu Gln Val Thr Glu Ala Phe Arg Glu  
                             355                            360                            365  
 Phe Thr Lys Gly Asn His Asn Ile Leu Ile Ala Tyr Arg Asp Arg Leu  
                             370                            375                            380  
 Lys Ala Ile Arg Thr Thr Leu Glu Val Ser Pro Phe Phe Lys Cys His  
 385                            390                            395                            400

Glu Val Ile Gly Ser Ser Leu Leu Phe Ile His Asp Lys Lys Glu Gln  
 405 410 415

Ala Lys Val Trp Met Ile Asp Phe Gly Lys Thr Thr Pro Leu Pro Glu  
 420 425 430

Gly Gln Thr Leu Gln His Asp Val Pro Trp Gln Glu Gly Asn Arg Glu  
 435 440 445

Asp Gly Tyr Leu Ser Gly Leu Asn Asn Leu Val Asp Ile Leu Thr Glu  
 450 455 460

Met Ser Gln Asp Ala Pro Leu Ala  
 465 470

<210> 7

<211> 604

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Asn Ser Ala Glu Ser Pro Gln Ala Glu Phe Trp Thr Asp Gly Gln Thr  
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ala Ala Gly Leu Gly Val Glu Thr Glu Arg Pro Lys Gln  
 20 25 30

Lys Thr Glu Pro Asp Arg Ser Ser Leu Arg Thr His Leu Glu Trp Ser  
 35 40 45

Trp Ser Glu Leu Glu Thr Thr Cys Leu Trp Thr Glu Thr Gly Thr Asp  
 50 55 60

Gly Leu Trp Thr Asp Pro His Arg Ser Asp Leu Gln Phe Gln Pro Glu  
 65 70 75 80

Glu Ala Ser Pro Trp Thr Gln Pro Gly Val His Gly Pro Trp Thr Glu  
 85 90 95

Leu Glu Thr His Gly Ser Gln Thr Gln Pro Glu Arg Val Lys Ser Trp  
 100 105 110

Ala Asp Asn Leu Trp Thr His Gln Asn Ser Ser Ser Leu Gln Thr His  
 115 120 125

Pro Glu Gly Ala Cys Pro Ser Lys Glu Pro Ser Ala Asp Gly Ser Trp  
 130 135 140

Lys Glu Leu Tyr Thr Asp Gly Ser Arg Thr Gln Gln Asp Ile Glu Gly  
 145 150 155 160

Pro Trp Thr Glu Pro Tyr Thr Asp Gly Ser Gln Lys Lys Gln Asp Thr  
 165 170 175

Glu Ala Ala Arg Lys Gln Pro Gly Thr Gly Gly Phe Gln Ile Gln Gln  
 180 185 190

Asp Thr Asp Gly Ser Trp Thr Gln Pro Ser Thr Asp Gly Ser Gln Thr  
 195 200 205



Ala Pro Gly Thr Asp Cys Leu Leu Gly Glu Pro Glu Asp Gly Pro Leu  
 210 215 220  
 Glu Glu Pro Glu Pro Gly Glu Leu Leu Thr His Leu Tyr Ser His Leu  
 225 230 235 240  
 Lys Cys Ser Pro Leu Cys Pro Val Pro Arg Leu Ile Ile Thr Pro Glu  
 245 250 255  
 Thr Pro Glu Pro Glu Ala Gln Pro Val Gly Pro Pro Ser Arg Val Glu  
 260 265 270  
 Gly Gly Ser Gly Gly Phe Ser Ser Ala Ser Ser Phe Asp Glu Ser Glu  
 275 280 285  
 Asp Asp Val Val Ala Gly Gly Gly Gly Ala Ser Asp Pro Glu Asp Arg  
 290 295 300  
 Ser Gly Ser Lys Pro Trp Lys Lys Leu Lys Thr Val Leu Lys Tyr Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Phe Val Val Ser Phe Arg Lys His Tyr Pro Trp Val Gln Leu Ser  
 325 330 335  
 Gly His Ala Gly Asn Phe Gln Ala Gly Glu Asp Gly Arg Ile Leu Lys  
 340 345 350  
 Arg Phe Cys Gln Cys Glu Gln Arg Ser Leu Glu Gln Leu Met Lys Asp  
 355 360 365  
 Pro Leu Arg Pro Phe Val Pro Ala Tyr Tyr Gly Met Val Leu Gln Asp  
 370 375 380  
 Gly Gln Thr Phe Asn Gln Met Glu Asp Leu Leu Ala Asp Phe Glu Gly  
 385 390 395 400  
 Pro Ser Ile Met Asp Cys Lys Met Gly Ser Arg Thr Tyr Leu Glu Glu  
 405 410 415  
 Glu Leu Val Lys Ala Arg Glu Arg Pro Arg Pro Arg Lys Asp Met Tyr  
 420 425 430  
 Glu Lys Met Val Ala Val Asp Pro Gly Ala Pro Thr Pro Glu Glu His  
 435 440 445  
 Ala Gln Gly Ala Val Thr Lys Pro Arg Tyr Met Gln Trp Arg Glu Thr  
 450 455 460  
 Met Ser Ser Thr Ser Thr Leu Gly Phe Arg Ile Glu Gly Ile Lys Lys  
 465 470 475 480  
 Ala Asp Gly Thr Cys Asn Thr Asn Phe Lys Lys Thr Gln Ala Leu Glu  
 485 490 495  
 Gln Val Thr Lys Val Leu Glu Asp Phe Val Asp Gly Asp His Val Ile  
 500 505 510  
 Leu Gln Lys Tyr Val Ala Cys Leu Glu Glu Leu Arg Glu Ala Leu Glu  
 515 520 525

Ile Ser Pro Phe Phe Lys Thr His Glu Val Val Gly Ser Ser Leu Leu  
530 535 540

Phe Val His Asp His Thr Gly Leu Ala Lys Val Trp Met Ile Asp Phe  
545 550 555 560

Gly Lys Thr Val Ala Leu Pro Asp His Gln Thr Leu Ser His Arg Leu  
565 570 575

Pro Trp Ala Glu Gly Asn Arg Glu Asp Gly Tyr Leu Trp Gly Leu Asp  
580 585 590

Asn Met Ile Cys Leu Leu Gln Gly Leu Ala Gln Ser  
595 600

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 01/02708

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N9/12 C12N15/54 C12N5/10 A61K38/00 A61P25/28  
A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K A61P A01K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBL, CHEM ABS Data, MEDLINE, SCISEARCH, EMBASE, BIOTECHNOLOGY ABS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE GENEMBL 'Online! 24 March 2000 (2000-03-24) ADAMS ET AL.: "Drosophila melanogaster genomic scaffold 1420000013386055 section 19 of 63" XP002167629 Accession AE003626; see nucleotides 73910 to 74190 -&amp; DATABASE SWISS 'Online! 1 May 2000 (2000-05-01) ADAMS ET AL.: "Drosophila melanogaster CG4026 protein" XP002167630 Accession Q9VL83</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	<p>2,5,6, 8-12, 16-18</p>

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 January 2002

Date of mailing of the international search report

07/02/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

ALCONADA RODRIG..., A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/02708

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE GENEMBL 'Online!  27 March 2000 (2000-03-27)  ADAMS ET AL.: "Drosophila melanogaster  genomic scaffold 142000013386053 section 9  of 30"  XP002167631  Accession AE003492; see nucleotides 68620  to 69620  -&amp; DATABASE SWISS 'Online!  1 May 2000 (2000-05-01)  ADAMS ET AL.: "Drosophila melanogaster  CG1639 protein"  XP002167632  Accession Q9VYE6</p>	7-12, 16-18
A	<p>CLANDININ THOMAS R ET AL: "Inositol  trisphosphate mediates a RAS-independent  response to LET-23 receptor tyrosine  kinase activation in C. elegans."  CELL,  vol. 92, no. 4,  20 February 1998 (1998-02-20), pages  523-533, XP002151613  ISSN: 0092-8674  cited in the application  the whole document</p>	2-12, 16-18
A	<p>ALDASHEV A A ET AL: "SPECIFIC PROTEINS  SYNTHESIZED IN HUMAN LYMPHOCYTES DURING  HYPOXIA"  AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY,  vol. 261, no. 4 SUPPL., 1991, pages 92-96,  XP000994719  ISSN: 0002-9513  table 1</p>	1,13,15
A	<p>SORIANO SALVADOR ET AL: "Membrane  association, localization and topology of  rat inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase  B: Implications for membrane traffic and  Ca-2+ homoeostasis."  BIOCHEMICAL JOURNAL,  vol. 324, no. 2, 1997, pages 579-589,  XP001001598  ISSN: 0264-6021  cited in the application  figure 4</p>	1,14

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/FR 01/02708

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>CHOI K Y ET AL: "Biochemical characterization of the transgenic mouse deficient of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase."            FASEB JOURNAL,            vol. 10, no. 6, 1996, page A1396            XP000993531            Joint Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, the American Society for Investigative Pathology and the American Association of Immunologists; New Orleans, Louisiana, USA;            June 2-6, 1996            ISSN: 0892-6638            abstract</p>	18

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem... Internationale No

PCT/FR 01/02708

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N9/12 C12N15/54 C12N5/10 A61K38/00 A61P25/28  
A01K67/027

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N A61K A61P A01K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBL, CHEM ABS Data, MEDLINE, SCISEARCH, EMBASE, BIOTECHNOLOGY ABS

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>DATABASE GENEMBL 'en ligne! 24 mars 2000 (2000-03-24) ADAMS ET AL.: "Drosophila melanogaster genomic scaffold 1420000013386055 section 19 of 63" XP002167629 Accession AE003626; see nucleotides 73910 to 74190 -&amp; DATABASE SWISS 'en ligne! 1 mai 2000 (2000-05-01) ADAMS ET AL.: "Drosophila melanogaster CG4026 protein" XP002167630 Accession Q9VL83</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	<p>2,5,6, 8-12, 16-18</p>

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

\*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

\*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

\*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

\*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

\*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

23 janvier 2002

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

07/02/2002

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

ALCONADA RODRIG..., A

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>DATABASE GENEMBL 'en ligne!  27 mars 2000 (2000-03-27)  ADAMS ET AL.: "Drosophila melanogaster  genomic scaffold 142000013386053 section 9  of 30"  XP002167631  Accession AE003492; see nucleotides 68620  to 69620  -&amp; DATABASE SWISS 'en ligne!  1 mai 2000 (2000-05-01)  ADAMS ET AL.: "Drosophila melanogaster  CG1639 protein"  XP002167632  Accession Q9VYE6</p>	7-12, 16-18
A	<p>CLANDININ THOMAS R ET AL: "Inositol  trisphosphate mediates a RAS-independent  response to LET-23 receptor tyrosine  kinase activation in C. elegans."  CELL,  vol. 92, no. 4,  20 février 1998 (1998-02-20), pages  523-533, XP002151613  ISSN: 0092-8674  cité dans la demande  le document en entier</p>	2-12, 16-18
A	<p>ALDASHEV A A ET AL: "SPECIFIC PROTEINS  SYNTHESIZED IN HUMAN LYMPHOCYTES DURING  HYPOXIA"  AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY,  vol. 261, no. 4 SUPPL., 1991, pages 92-96,  XP000994719  ISSN: 0002-9513  tableau 1</p>	1,13,15
A	<p>SORIANO SALVADOR ET AL: "Membrane  association, localization and topology of  rat inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase  B: Implications for membrane traffic and  Ca-2+ homoeostasis."  BIOCHEMICAL JOURNAL,  vol. 324, no. 2, 1997, pages 579-589,  XP001001598  ISSN: 0264-6021  cité dans la demande  figure 4</p>	1,14

-/--

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 01/02708

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>CHOI K Y ET AL: "Biochemical characterization of the transgenic mouse deficient of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase."</p> <p>FASEB JOURNAL, vol. 10, no. 6, 1996, page A1396 XP000993531</p> <p>Joint Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, the American Society for Investigative Pathology and the American Association of Immunologists; New Orleans, Louisiana, USA; June 2-6, 1996 ISSN: 0892-6638 abrégé</p> <p>-----</p>	18